

Entwicklung hochsensitiver Pseudovirusassays für HIV-1 und SARS-CoV-2 auf Basis lentiviraler Vektoren

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Chemie der Fakultät für Mathematik,
Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg

Vorgelegt von

Jannis Hendrik Woens

Hamburg 2026

1. Gutachter: Prof. Dr. Boris Fehse

2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfram Brune

Disputation am 04.09.2026

Prüfungskommission:

PD Dr. Markus Perbandt (Vorsitz)

Prof. Dr. Boris Fehse

Prof. Dr. Hartmut Schlüter

Diese Arbeit wurde zwischen August 2019 und Juni 2026 in der Forschungsgruppe Zell- und Gentherapie des Zentrums für Onkologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) unter der Betreuung durch Prof. Dr. Boris Fehse durchgeführt. Die Betreuung am Fachbereich Chemie der Universität Hamburg fand durch Prof. Dr. Wolfram Brune statt.

I. Publikationen

Durch meine Anwendung des HIV-1-Pseudovirusassays zur Untersuchung von Leadsubstanzen konnte auch das Hochdurchsatzscreening validiert werden, aus dem die Substanzen hervorgegangen waren. Dieser Teil, der primär im Bereich der in Kapitel 5.1.1. beschriebenen Vorarbeiten liegt, wird in folgender Publikation beschrieben:

A High-Throughput HIV-1 Drug Screening Platform, Based on Lentiviral Vectors and Compatible with Biosafety Level 1

Ellinger B, Pohlmann D, Woens J, Jäkel FM, Reinshagen J, Stocking C, Prassolov VS, Fehse B, Riecken K.
2020 in *Viruses*, doi: 10.3390/v12050580

Meine Arbeiten zum SARS-CoV-2-Pseudovirusassay haben Erkenntnisse generiert, durch die die Sequenzaufklärung des Vektorimpfstoffes ChAdOx1 ermöglicht wurde und die qPCR zur Quantifizierung etabliert werden konnte, wie in folgender Publikation beschrieben:

Digital PCR to quantify ChAdOx1 nCoV-19 copies in blood and tissues

Badbaran A, Mailer RK, Dahlke C, Woens J, Fathi A, Mellinghoff SC, Renné T, Addo MM, Riecken K, Fehse B.
2021 in *Molecular Therapy Methods & Clinical Development*, doi: 10.1016/j.omtm.2021.10.002.

Der in dieser Arbeit vorgestellte und von mir etablierte SARS-CoV-2-Pseudovirusassay wurde von Dr. Maria Kuzikov für die Erforschung verschiedener Inhibitoren des Zelleintritts von SARS-CoV-2 verwendet, wie in folgender Publikation beschrieben:

High-throughput drug screening allowed identification of entry inhibitors specifically targeting different routes of SARS-CoV-2 Delta and Omicron/BA.1

Kuzikov M, Woens J, Zaliani A, Hambach J, Eden T, Fehse B, Ellinger B, Riecken K.
2022 in *Biomedicine & Pharmacotherapy*, doi: 10.1016/j.biopha.2022.113104.

Die Analyse der Neutralisation verschiedener SARS-CoV-2-Pseudovirusvarianten durch neu generierte Schwereketten-Antikörper aus Kameliden wurde für das in der folgenden Publikation beschriebene Projekt verwendet:

Generation of nanobodies from transgenic 'LamaMice' lacking an endogenous immunoglobulin repertoire.

Eden T, Schaffrath AZ, Wesolowski J, Stähler T, Tode N, Richter N, Schäfer W, Hambach J, Hermans-Borgmeyer I, Woens J, Le Gall CM, Wendler S, Linke-Winnebeck C, Stobbe M, Budnicki I, Wanney A, Heitz Y, Schimmelpfennig L, Schweitzer L, Zimmer D, Stahl E, Seyfried F, Gebhardt AJ, Dieckow L, Riecken K, Fehse B, Bannas P, Magnus T, Verdoes M, Figdor CG, Hartlepp KF, Schleier H, Fünér J, Tomas NM, Haag F, Rissiek B, Mann AM, Menzel S, Koch-Nolte F.
2024 in *Nature Communications*, doi: 10.1038/s41467-024-48735-x.

Die aus den in Kapitel 5.1.2. – 5.1.4. beschriebenen Versuchen hervorgegangenen Erkenntnisse sind in Vorbereitung zur Publikation in einem Manuskript mit folgendem voraussichtlichen Titel und Autoren:

Target identification and HIV-1 resistance modeling for drug testing on lentiviral vectors in biosafety level 1/2 conditions

Woens J, Ellinger B, Chen Y, Kirchmair J, Fehse B, Riecken K
Manuskript in Vorbereitung

II. Inhaltsverzeichnis

I. Publikationen	I
II. Inhaltsverzeichnis.....	II
III. Abkürzungsverzeichnis.....	V
IV. Zusammenfassung	VIII
V. Abstract.....	IX
1. Einleitung	1
1.1. Die HIV-Pandemie	1
1.1.1. HIV-Infektion, Krankheitsverlauf, AIDS	3
1.1.2. Aufbau und Virusbiologie von HIV-1.....	4
1.1.3. Replikationszyklus von HIV-1	5
1.1.4. Therapie von HIV-1 und AIDS.....	6
1.1.5. Ziele der globalen Bekämpfung von HIV.....	8
1.1.6. Neue Ansätze der Therapie von HIV-1.....	10
1.2. Die Covid-19 Pandemie.....	11
1.2.1. SARS-CoV-2 Infektion und Krankheitsverlauf	12
1.2.2. Ordnung von Coronaviren und SARS-CoV-2	14
1.2.3. Virusbiologie von Coronaviren und SARS-CoV-2.....	15
1.2.4. SARS-CoV-2 Zelleintritt und Replikation	16
1.2.5. Virusevolution und Varianten	18
1.2.6. Therapie von SARS-CoV-2	20
1.3. Lentivirale Vektoren.....	22
1.3.1. Zellbasierte Assays in Forschung und Wirkstoffentwicklung.....	24
1.3.2. Pseudotypisierung lentiviraler Vektoren	26
1.3.3. HIV-1 Pseudovirusassay	26
1.3.3.1. Resistenzmutationen im HIV-1 Pseudovirusassay	28
1.3.4. SARS-CoV-2-Pseudovirusassay	28
1.3.4.1. Nachweis von Antikörpern gegen SARS-CoV-2	29
2. Zielsetzung der Arbeit	31
3. Geräte und Materialien.....	32
3.1. Geräte	32
3.2. Materialien.....	33
4. Methoden	40
4.1. Versuchsübergreifende Methoden.....	40
4.1.1. Kultivierung von humanen Zellen	40

4.1.2. Herstellung von HEK293T-ACE2-Zellen	40
4.1.3. Herstellung lentiviraler Vektoren in HEK293T-Zellen	40
4.1.3.1. Generation modifizierter lentiviraler Vektoren im HIV-1-Assay	41
4.1.3.2. Generation von SARS-CoV-2-Pseudoviren	42
4.1.4. eGFP-basierter Inhibitionsassay mittels Durchflusszytometrie	43
4.1.5. Luciferase-basierter Inhibitionsassay mittels Luminometrie	43
4.2. HIV-1 Inhibitionsassay	44
4.2.1. Quantifizierung der Inhibition von integrierenden Vektoren	44
4.2.2. Analyse der Inhibition von nicht integrierenden Vektoren	45
4.2.3. Analyse der Inhibition von resistenten Vektoren	45
4.2.4. Toxizitätsassay für Substanzen und HIV-1-Medikamente	46
4.3. SARS-CoV-2 Inhibitionsassay	46
4.3.1. Analyse der Antikörperaktivität in Serumproben	46
4.3.2. Analyse der Inhibition durch Peptide	47
4.3.3. Analyse der Inhibition durch niedermolekulare Substanzen	47
4.3.4. Analyse der Inhibition durch Schwereketten-Antikörper	48
4.4. Mathematische Korrektur von Transduktionsraten	48
5. Ergebnisse	50
5.1. HIV-1 Pseudovirusassay	50
5.1.1. Vorarbeiten: Aktivität von HIV-1 inhibierenden Substanzen	50
5.1.2. Vergleich der Testsubstanzen mit zugelassenen Therapeutika	53
5.1.3. ADME/PK Analyse der vielversprechendsten Substanzen	54
5.1.4. Toxizitätsassay für Testsubstanzen und HIV-1-Medikamente	55
5.2. SARS-CoV-2 Pseudovirusassay	58
5.2.1. Herstellung von lentiviralen SARS-CoV-2-Pseudoviren	59
5.2.2. Herstellung von stark ACE2-exprimierenden HEK293T-Zellen	60
5.2.3. Neutralisation von SARS-CoV-2-Pseudovirus durch Serum	61
5.2.3.1. Neutralisation durch Seren im Verlauf des Impfprotokolls	62
5.2.4. Inhibition der Transduktion durch therapeutische Substanzen	64
5.2.4.1. Inhibition durch neutralisierende Peptide	64
5.2.4.2. Testung niedermolekularer Inhibitoren von SARS-CoV-2	65
5.2.4.3. Spezifische Wirkung und Toxizität von 8 Substanzen	66
5.2.4.4. Raloxifen inhibiert SARS-CoV-2-Pseudoviren in vitro	67
5.2.4.5. Inhibition durch Raloxifen ist SARS-Envelope-spezifisch	68
5.2.4.6. Inhibition verschiedener Virusvarianten durch Raloxifen auf verschiedenen Zelltypen	68
5.2.5. Neutralisierende Schwereketten-Antikörper gegen SARS-CoV-2	70

5.2.5.1. Neutralisation von SARS-CoV-2-WT-Pseudovirus	70
5.2.5.2. Neutralisation von Omikron/BA.2-Pseudovirus.....	72
5.2.5.3. Keine Neutralisation von Omikron/BA.5-Pseudovirus.....	73
6. Diskussion: Adaptive und sensitive lentivirale Vektorassays.....	75
6.1. Ein Panel hochaktiver Leads Substanzen für HIV-1	75
6.1.1. Vorarbeiten, Auswahl der 5 vielversprechendsten Substanzen	75
6.1.2. Aktivität der 5 vielversprechendsten Substanzen und zugelassener Therapeutika gegen NNRTI-resistenten Vektor	76
6.1.3. ADME/PK Analyse der 5 vielversprechendsten Substanzen	76
6.1.4. Toxizität der 5 vielversprechendsten Substanzen und zugelassener Therapeutika	77
6.1.5. Substanz 23 als vielversprechendster Kandidat.....	78
6.2. SARS-CoV-2-Pseudovirusassay	79
6.2.1. Herstellung von lentiviralen SARS-CoV-2-Pseudoviren.....	79
6.2.2. Herstellung von stark ACE2-exprimierenden HEK293T-Zellen	80
6.2.3. Neutralisation von SARS-CoV-2-Pseudovirus durch Serum	80
6.2.3.1. Neutralisation im Verlauf des Impfprotokolls	80
6.2.4. Inhibition der Transduktion durch therapeutische Substanzen	83
6.2.4.1. Inhibition durch neutralisierende Peptide.....	83
6.2.4.2. Testung niedermolekularer Inhibitoren von SARS-CoV-2.....	84
6.2.4.3. Spezifische Wirkung und Toxizität von 8 Substanzen.....	84
6.2.4.4. Raloxifen neutralisiert SARS-CoV-2 in vitro	84
6.2.4.5. Neutralisation durch Raloxifen ist SARS-Envelope-spezifisch.....	85
6.2.4.6. Inhibition von verschiedenen Virusvarianten durch Raloxifen auf verschiedenen Zelltypen	85
6.2.4.7. Beurteilung von Raloxifen als Drug-Repurposing Kandidat	86
6.2.5. Neutralisierende Schwereketten-Antikörper gegen SARS-CoV-2-Varianten.....	87
6.2.5.1. Neutralisation von SARS-CoV-2-WT-Pseudovirus	88
6.2.5.2. Neutralisation von Omikron/BA.2-Pseudovirus.....	88
6.2.5.3. Keine Neutralisation von Omikron/BA.5-Pseudovirus.....	89
7. Fazit - Lentivirale Vektor-Assays als virologische Methode.....	90
8. Literaturverzeichnis	92
9. Anhang: Auflistung der verwendeten Gefahrstoffe	106
10. Danksagung.....	108
11. Disclaimer.....	109
12. Eidesstattliche Versicherung.....	110

III. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Δ	Delta, Deletion
3CL ^{Pro}	3C-ähnliche Protease (von SARS-CoV-2)
3TC	Lamivudin, HIV-1 Therapeutikum (NRTI)
3'	3'-Ende eines +Sense Nukleotidstranges
5'	5'-Ende eines +Sense Nukleotidstranges
ABCD1	<i>ATP binding cassette subfamily D member 1</i> , für CALD relevantes Gen
ACE2	Angiotensin-konvertierendes Enzym 2, (<i>angiotensin-converting enzyme 2</i>)
AIDS	Erworbenes Immunschwächesyndrom (<i>acquired immune deficiency syndrome</i>)
AZT	Azidothymidin, HIV-1 Therapeutikum (NRTI)
BCMA	B-Zell-Reifungsantigen (<i>B-cell maturation antigen</i>)
bp	Basenpaar, Basenpaare
CaCo2	Humane kolorektale Adenokarzinom-Zelllinie
Calu3	Humane lungenepitheliale Adenokarzinom-Zelllinie
CAR	Chimärer Antigenrezeptor (<i>chimeric antigen receptor</i>)
cART	Antiretrovirale Kombinationstherapie (<i>combined antiretroviral therapy</i>)
CALD	Zerebrale Adrenoleukodystrophie (<i>cerebral adrenoleukodystrophy</i>)
CCR5	CC-Motiv-Chemokinrezeptor 5
CCR5Δ32	CCR5-Gen mit Deletion von 32 Basenpaaren
CD4	T-Zell Corezeptor von T-Helferzellen (<i>cluster of differentiation 4</i>)
CD19	B-Lymphozyten-Antigen (<i>cluster of differentiation 19</i>)
CD34	Antigen hämatopoetischer Stammzellen (<i>cluster of differentiation 34</i>)
cDNA	Komplementäre DNA (Produkt der reversen Transkription von RNA)
CMV	Cytomegalovirus
COVID-19	Erkrankung mit SARS-CoV-2 (<i>Coronavirus disease 2019</i>)
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
d	Tag(e) (<i>days</i>)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP(s)	Deoxyribonukleotridtriphosphat(e)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DTG	Dolutegravir, HIV-1 Therapeutikum (INSTI)
E	Envelope, Hüllprotein (hier von SARS-CoV-2)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFV	Efavirenz, HIV-1 Therapeutikum (NNRTI)
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> , antikörperbasiertes Nachweisverfahren
Env	Hüllproteine (von HIV, soweit für sich stehend)
ETV	Etravirin, HIV-1 Therapeutikum (NNRTI)
eGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i> , (verbessertes) grün fluoreszierendes Protein
FBS	Fetales Rinderserum (<i>fetal bovine serum</i>)

FDA	Food and Drug Administration, (u.a.) Arzneimittelbehörde der USA
FSC	Vorwärtsstreuung (<i>forward scatter</i>)
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
Gag	Gruppenspezifisches Antigen von HIV-1 (Proteine p17, p24 und p7)
gDNA	Genomische DNA
gp120/gp41	Oberflächenproteine von HIV-1
h	Stunde
hACE2	Humaner ACE2 Rezeptor (siehe ACE2)
HCoV	Humane Coronaviren
HCoV-229E	Humanes (Alpha-)Coronavirus 229E
HCoV-NL63	Humanes (Alpha-)Coronavirus NL63
HCoV-HKU1	Humanes (Beta-)Coronavirus HKU1
HCoV-OC43	Humanes (Beta-)Coronavirus OC43
HEK293T	Humane Embryonale Nierenzelllinie 293 (<i>human embryonic kidney cell</i>)
HIV	Humanes Immunschwäche Virus, Auslöser von AIDS
HTS	Hochdurchsatzscreening (<i>high-throughput-screening</i>)
IC50	Für 50% Inhibition notwendige Konzentration
kb	Kilobase, 1000 Basen
kDa	Kilodalton, 1000 Dalton
LEDGF/p75	Zellulärer Cofaktor der HIV-Infektion (<i>lens epithelium-derived growth factor</i>)
LeGO	Lentivirale Gen-Ontologie Vektoren (<i>lentiviral gene ontology vectors</i>)
LTR	Lange repetitive terminale Sequenzen (<i>long terminal repeat</i>)
M	Membran(protein)
MA	Matrixprotein (von HIV-1)
ME/CFS	Myalgische Enzephalomyelitis/das Chronische Fatigue-Syndrom
MERS-CoV	Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus
Mg ²⁺	Magnesium-Ionen
min	Minute
Mio	Million
MLD	Metachromatische Leukodystrophie
MLV	Moloney Maus-Leukämie Virus (<i>Moloney mouse leukemia virus</i>)
mRNA	Messenger RNA
n	Anzahl
N	Nukleokapsid(protein) (hier von SARS-CoV-2)
NC	Nukleokapsidprotein (von HIV-1)
n.d.	Nicht detektierbar
Nef	Virales Protein von HIV-1 (<i>negative regulatory factor / negative effector</i>)
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomol
NNRTI	Nicht-nukleosidischer Reverse Transkriptase Inhibitor
NRTI	Nukleosidischer Reverse Transkriptase Inhibitor
ns	Nicht signifikant
nsps	Nicht-strukturelle Proteine (hier von SARS-CoV-2)
NT50	Für 50% Neutralisation notwendiger Titer
NVP	Nevirapin, HIV-1 Therapeutikum (NNRTI)

ORF	Offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
p15	Virales Protein r von HIV-1 (Vpr)
p17	Matrixprotein von HIV-1 (MA)
p24	Nukleocapsidprotein von HIV-1 (NC)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin, rot fluoreszierendes Protein
PI	Proteaseinhibitor, Klasse von HIV-1 Therapeutika
PI(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol-(4,5)-bis-Phosphat
PM1	Humane CD4+ T-Zelllinie
PrEP	Präexpositionsprophylaxe (für HIV-1)
RAL	Raltegravir, HIV-1 Therapeutikum (INSTI)
RBD	Rezeptorbindungsdomäne
Rev	Regulator der Virus-Proteinexpression von HIV-1
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RPV	Rilpivirin, HIV-1 Therapeutikum (NNRTI)
RRE	<i>Rev-response-element</i> von HIV-1
RT	Raumtemperatur
RTI	Reverse-Transkriptase-Inhibitor, Klasse von HIV-1 Therapeutika
RTK	Replikase-Transkriptase-Komplex
s	Sekunde
S	Spike(protein), Oberflächenprotein von SARS-CoV-2
S1	Subeinheit 1 des Spikeproteins von SARS-CoV-2, Rezeptorbindungsdomäne
S2	Subeinheit 2 des Spikeproteins von SARS-CoV-2, Membranfusionsdomäne
SARS-CoV(-1)	Schweres-akutes-Atemwegssyndrom-Coronavirus (<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus</i>)
SARS-CoV-2	Schweres-akutes-Atemwegssyndrom-Coronavirus Typ 2 (<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2</i>)
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
shRNA	kurze Haarnadel-RNA, regulatorisches RNA-Molekül (<i>short hairpin RNA</i>)
SIV	Simianes Immundefizienz-Virus
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>side scatter</i>)
Tat	Trans-Aktivator der Transkription von HIV-1
TDF	Tenofovir diproxil fumarat, HIV-1 Therapeutikum (NRTI)
TMPRSS2	Transmembran-Serinprotease 2
tRNA	Transfer-RNA
UNAIDS	Programm der Vereinten Nationen (UN) zur Bekämpfung von HIV/AIDS
UTR	Untranslatierte Region eines Gens (<i>untranslated region</i>)
VeroE6	Nierenzelllinie aus dem Afrikanischen Grünen Affen
Vif	Viraler Infektionsfaktor von HIV-1 (<i>viral infectivity factor</i>)
VOC	SARS-CoV-2-Variante von besonderer Bedeutung (<i>variant of concern</i>)
VOI	SARS-CoV-2 Variante von besonderem Interesse (<i>variant of interest</i>)
Vpr	Virales Protein r von HIV-1 (p15)
Vpu	Virales Protein u von HIV-1
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organisation</i>)
WT	Wildtyp

IV. Zusammenfassung

Lentivirale Vektoren sind ein vielseitiges Instrument der biomedizinischen Forschung. Durch die Nutzung verschiedener viraler Hüllproteine können sie zur zuverlässigen Transduktion einer großen Bandbreite an Zielzellen genutzt werden, während ihr Ursprung im HI-Virus die stabile Integration in das zelluläre Genom ermöglicht. Moderne lentivirale Vektoren der dritten Generation sind sicher und für Hochdurchsatzmethoden geeignet. Neben ihrer Verwendung als Vektor für Anwendungen wie die Markierung von Zellen mit Fluoreszenzproteinen stellen sie auch ein attraktives Forschungsobjekt sowie ein Modell für virale Infektionen dar. Die konservierten Elemente der HIV-1-Virusbiologie dienen als Ansatzpunkt für die Erforschung des viralen Lebenszyklus und seiner Beeinflussung. Die breite Palette möglicher Pseudotypisierungen im modularen Vektorsystem ermöglicht zudem die Erforschung der Oberflächeninteraktionen anderer Viren mit deren Wirtszellen.

Diese Arbeit setzt sich mit verschiedenen Anwendungsgebieten im Bereich der Virologie auseinander. Die vorgestellten Versuche im ersten Teil beschreiben einen auf lentiviralen Vektoren basierenden Assay zur Identifizierung, Validierung und Charakterisierung von potenziellen Therapeutika für HIV-1. Dabei konnte die Eignung lentiviraler Vektoren für diese frühe Phase der Wirkstoffentwicklung demonstriert werden und ein Panel vielversprechender Leadsubstanzen für die weitere Entwicklung als Medikamente identifiziert werden.

Die im zweiten Teil dargestellten Inhibitionsversuche an Vektoren, die mit dem SARS-CoV-2-Hüllprotein pseudotypisiert wurden, untermauern die Vielseitigkeit des zellkulturbasierten Pseudovirusassays. Bei der Untersuchung der Neutralisation dieser Pseudoviren durch das Serum geimpfter Personen generierte der Assay nicht nur zuverlässig erwartete und mit alternativen Verfahren übereinstimmende Daten, sondern bewies auch seine hohe Sensitivität. Im Rahmen eines Drug-Repurposing-Ansatzes wurde die Wirksamkeit für andere Indikationen zugelassener Medikamente gegen das SARS-CoV-2-Hüllprotein und seine Interaktion mit Wirtszellen untersucht, wobei ein Wirkstoff mit therapeutischem Potenzial identifiziert und charakterisiert werden konnte. Schließlich wurde die Neutralisationsaktivität neu generierter Schwereketten-Antikörper gegen verschiedene Pseudovirusvarianten getestet. Hierdurch wurden wertvolle Erkenntnisse über die Moleküle gesammelt und der Nutzen einer schnellen Anpassung des Assays an pandemische Entwicklungen wie das Auftreten neuer Virusvarianten demonstriert.

V. Abstract

Lentiviral vectors are a versatile tool in medical research that can be used for the reliable transduction of various target cells via the use of different viral envelopes. Derived from HIV-1, they retain the ability to stably integrate into the host genome. The development of the technique has led to its third generation, which is remarkably safe and suitable for high-throughput applications. Lentiviral vectors can serve both as delivery vehicles for applications such as fluorescent protein expression and as research objects and models of viral infection in their own right. Conserved aspects of HIV-1 biology serve as valuable targets for studying the viral life cycle and strategies for its inhibition. The more variable parts such as the different viral envelopes that can be used to pseudotype the vector present an opportunity to study the surface interactions of other viruses and their host cells.

The work presented here deals with different areas of application within the field of virology. The first part shows how a lentiviral vector assay can be used to identify, validate and characterize novel compounds with potential in HIV-1 therapy. Not only does it demonstrate the suitability of lentiviral vectors for the early stages of drug development, but also presents a panel of promising lead compounds for further therapeutic development that the assay identified.

The versatility of a cell culture-based assay with lentiviral vectors will be further elaborated on in the second part where it was applied to test methods of inhibiting particles pseudotyped with the envelope of the novel SARS-Coronavirus 2 that emerged in 2020. When used to test the neutralizing activity of sera from vaccinated individuals, it reliably generated results consistent with both prior expectations and other assays applied to the same samples. Furthermore, it proved to be sensitive even to small effects. It was also used to test approved drugs with potential to be repurposed for SARS-CoV-2, which led to the selection and validation of a promising therapeutic candidate. Finally, it was applied to test newly generated heavy-chain antibodies and their ability to neutralize different pseudoviral variants. This analysis led to valuable insight into the activity of these novel therapeutic molecules and also highlighted the value of an assay platform that can be rapidly adapted to emerging viral variants during a pandemic.

1. Einleitung

In dieser Arbeit beschreibe ich die Anwendung lentiviraler Vektoren als Modell zur Analyse zwei verschiedener Viren mit jeweils großer globaler Bedeutung. Zunächst gehe ich auf die beiden Viren, das Humane Immundefizienz-Virus 1 (Human Immunodeficiency Virus 1, HIV-1) und das Schwere-akutes-Atemwegssyndrom-Coronavirus Typ 2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2, SARS-CoV-2) ein, indem ich ihre globale Bedeutung als pandemische Erreger, die Virusbiologie und die bereits verfügbaren Behandlungsmethoden vorstelle. Im letzten Teil der Einleitung stelle ich dann den für die Arbeit zentralen Assay auf Basis lentiviraler Vektoren vor, mithilfe dessen ich Erkenntnisse zu beiden Viren und ihrer Behandlung generieren konnte.

1.1. Die HIV-Pandemie

HIV ist die Ursache für die Immunschwächekrankheit AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome), und stellt eine der bedeutendsten globalen Gesundheitsbedrohungen dar (Simon et al. 2006). Seit seiner Entdeckung im Jahr 1981 hat sich das Virus auf der ganzen Welt verbreitet und geschätzt 91,4 Millionen Menschen infiziert, von denen etwa 44,1 Millionen an den Folgen verstorben sind (UNAIDS Fact Sheet 2025). Auch 2024 wurden noch rund 1,3 Millionen Menschen neu infiziert und 630.000 verstarben an den Folgen von AIDS.

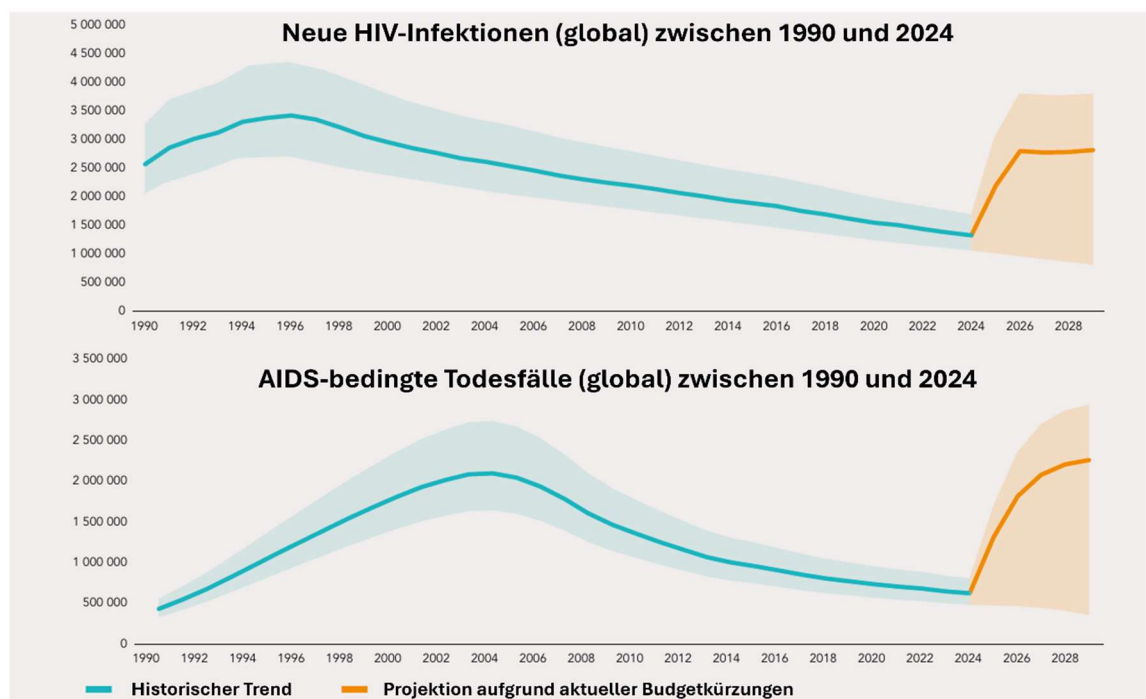


Abbildung 1: Verlauf jährlicher HIV-Infektionen und AIDS-bedingter Todesfälle. Sowohl Infektionen als auch Todesfälle sinken seit Jahren kontinuierlich, jedoch nicht in ausreichender Geschwindigkeit, um das von der WHO für 2025 gesetzte Ziel zu erreichen. Zudem ist der Kampf gegen HIV/AIDS durch Budgetkürzungen der Regierung der USA bedroht. (UNAIDS Report 2024) (eigene Übersetzung der Beschriftung).

Neuinfektionen und Todesfälle sind global rückgängig, die Inzidenz der neuen HIV-Infektionen als auch der Zugang zu therapeutischen Optionen sind jedoch global sehr ungleich verteilt. Während Nordamerika und Westeuropa geringere, zunehmend fallende Inzidenzen vorweisen können, ist das Virus gerade in Osteuropa und Zentralasien auf dem Vormarsch, wo es auf Gesundheitssysteme mit weniger Ressourcen zu seiner Bekämpfung trifft. Im Jahr 2025 haben die USA ihre Finanzierung der globalen HIV/AIDS-Bekämpfung eingeschränkt, was die Lage zusätzlich verschlechtert (UNAIDS Update 2025). Dabei ist vor allem HIV-1 von globaler Bedeutung (Sedláček 2025), sodass ab Kapitel 1.1.2. nur auf diese Variante als Untersuchungsobjekt und Basis des vorgestellten Assays eingegangen wird.

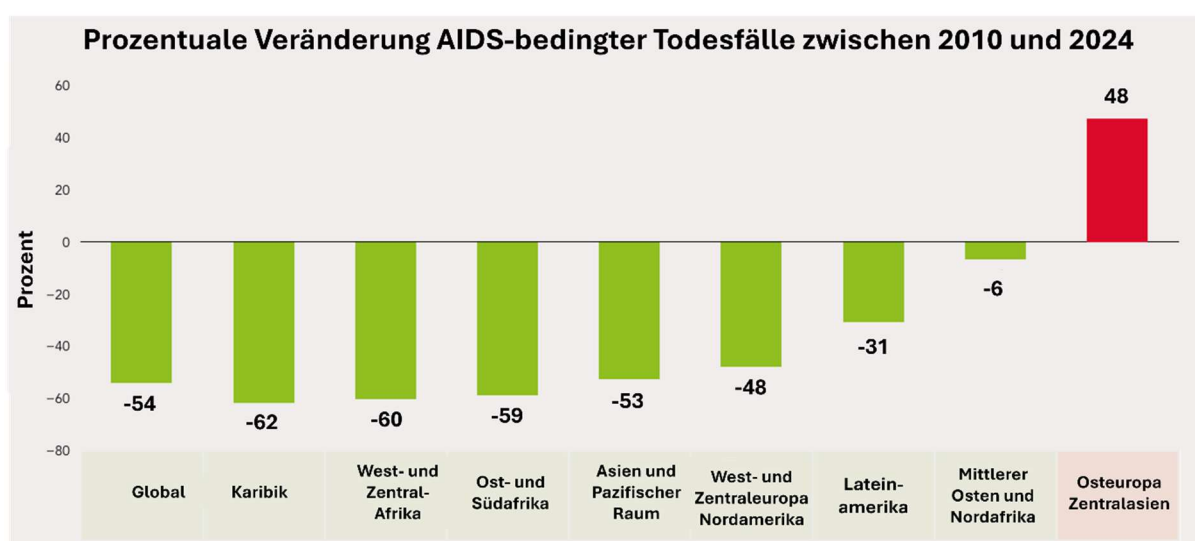


Abbildung 2: Prozentuale Veränderung der jährlichen AIDS-bedingten Todesfälle zwischen 2010 und 2024. Während sich die Todeszahlen im globalen Schnitt mehr als halbiert haben, nehmen sie in Osteuropa und Zentralasien sogar deutlich (48%) zu, was Grund zu großer Sorge ist. Die Entwicklung im Mittleren Osten und Nordafrika stagniert und hebt sich somit ebenfalls vom globalen Trend ab (UNAIDS Update 2025)(eigene Übersetzung der Beschriftung).

Die Entwicklung antiretroviraler Therapien hat die Dynamik der Erkrankung transformiert und HIV von einem Todesurteil zu einer behandelbaren chronischen Krankheit gemacht, wodurch die durchschnittliche Überlebenszeit ab der Diagnose erheblich verlängert wurde. Von den weltweit etwa 40,8 Millionen Menschen, die derzeit mit HIV leben, haben jedoch nur 31,6 Millionen Zugang zu antiretroviraler Therapie (siehe Kapitel 1.1.5) (UNAIDS Fact Sheet 2025). Die Behandlung von HIV-positiven Patienten erfordert eine lebenslange medikamentöse Therapie, was das Risiko mangelnder Compliance mit sich bringt. Aufgrund der hohen Mutationsrate des Virus wird die Behandlung bei lückenhafter Unterdrückung der Replikation durch Resistenzmutationen gegenüber den angewandten Medikamenten erschwert. Um dem Problem der Resistenzentwicklung zu begegnen, ist eine breite Palette von Medikamenten mit verschiedenen Wirkmechanismen und molekularen Angriffspunkten erforderlich. Der

Mangel an einer in der Breite anwendbaren, vollständigen Heilung für HIV, begründet den anhaltenden Bedarf nach effektiven Therapieoptionen, die aufgrund der lebenslangen Behandlung, möglichen langfristigen Nebenwirkungen und der Gefahr von sich entwickelnden Resistenzen auch für individuelle Patienten angepasst werden müssen. Bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe sollten daher nicht nur eine hohe Wirksamkeit und möglichst wenige unerwünschte Arzneimittelwirkungen, sondern auch die Fähigkeit zur Überwindung von Resistenzmutationen und möglichst geringe Kosten angestrebt werden. Die Bedeutung einer effektiven HIV-Bekämpfung reicht über medizinische Aspekte hinaus und hat erhebliche soziale und wirtschaftliche Auswirkungen. Im Kontext dieser globalen Herausforderung ist die Erforschung und Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze von entscheidender Bedeutung, um die Auswirkungen von HIV/AIDS zu mindern und letztlich eine Welt ohne diese lebensbedrohliche Krankheit zu ermöglichen.

1.1.1. HIV-Infektion, Krankheitsverlauf, AIDS

Die Infektion mit HIV findet primär über sexuellen Kontakt statt und führt zu einem komplexen Krankheitsverlauf, der häufig von anfänglicher akuter Infektion über eine asymptomatische Phase bis hin zur fortschreitenden Immunschwäche reicht. In den ersten Wochen nach der Infektion kann sich eine grippeähnliche akute Phase manifestieren, gefolgt von einer mehrere Jahre langen klinisch asymptomatischen Phase. Während dieser Zeit repliziert das Virus aktiv und schädigt das Immunsystem, insbesondere die CD4-T-Lymphozyten, die für die Abwehr von Infektionen von zentraler Bedeutung sind. Im Verlauf einer unbehandelten HIV-Infektion nimmt die Anzahl der CD4-Zellen ab, was die Abwehrfähigkeit des Immunsystems zunehmend beeinträchtigt. Diese fortgeschrittene Phase wird als das Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) bezeichnet. AIDS ist gekennzeichnet durch das Auftreten von schweren opportunistischen Infektionen wie Lungenentzündungen und Tuberkulose, sowie bestimmten Tumoren wie dem Kaposi-Sarkom und verschiedenen Lymphomen. Die Symptome variieren je nach den betroffenen Organsystemen, und die unbehandelte Krankheit führt oft innerhalb weniger Jahre zum Tod (Poorolajal et al. 2016). Die Entwicklung von AIDS kann jedoch durch antiretrovirale Therapien verlangsamt oder verhindert werden, die die Vermehrung des Virus und die Zerstörung der CD4-Zellen unterdrücken.

1.1.2. Aufbau und Virusbiologie von HIV-1

HIV-1 gehört zu den Lentiviren, einer Untergruppe der Retroviren, die sich durch ihre Fähigkeit zur Infektion nicht teilungsaktiver eukaryotischer Zellen auszeichnet. Das virale Genom besteht aus einsträngiger (+)RNA in zwei Kopien, neben denen zusätzlich die viralen Strukturproteine und Enzyme (reverse Transkriptase, Integrase und Protease) im reifen Viruspartikel enthalten sind. Im Viruspartikel schützen eine äußere Schicht aus dem Matrixprotein (MA) p17 und eine innere Kapsel aus dem Nukleocapsidprotein (NC) p24 die viralen Enzyme und RNA. Die virale Hülle, auch als Envelope bezeichnet, ist eine Lipiddoppelschicht, die während des als "budding" oder "Ausknospen" bezeichneten Ablösens von der Wirtszelle aus deren Membran gebildet wird. Dabei werden nicht nur die viralen Glykoproteine gp120 und gp41, auch *Envelope*-Proteine genannt, sondern auch Oberflächenproteine der Wirtszelle in die Virushülle integriert (Gelderblom 1991).

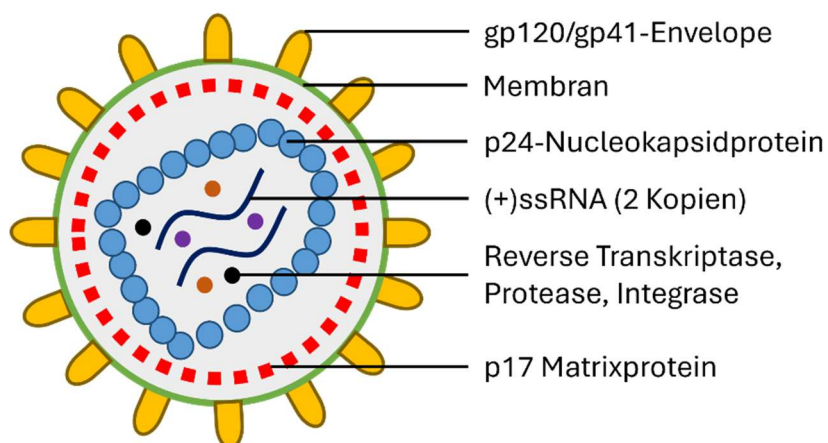


Abbildung 3: Schematischer Aufbau des HI-Virus. Auf der Membran des Virus sitzen die Envelope-Proteine gp120/gp41, mit denen das Virus an die Zielzelle bindet. Matrixprotein p17 und Nukleokapsidprotein p24 schützen in zwei Schichten die viralen Enzyme Reverse Transkriptase, Protease und Integrase sowie das Virusgenom, das in zwei Kopien einsträngiger (+)RNA vorliegt (Eigene Darstellung nach (Fanales-Belasio et al. 2010; Woens 2018)).

Das HIV-1-Genom umfasst die grundlegenden Gene Gag (group antigen), Pol (polymerase) und Env (envelope), die in allen Retroviren vorkommen, sowie spezifische akzessorische und regulatorische Gene, von denen einige auch in SIV und HIV-2 (vif, vpr, nef), andere exklusiv bei HIV-1 vorliegen (vpu) (Strebel 2013). Insgesamt kodieren diese Gene für 15 verschiedene Proteine. Darunter fallen Vif (viral infectivity factor, p23), Vpr (viral protein R, p15), Vpu (viral protein u), Nef (negative factor, p24), Tat (trans-activator of transcription) und Rev (regulator of viral gene expression). Diese Proteine spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation der viralen Replikation und der Beeinflussung der Wirtszellfunktionen. Die Vielfalt der kodierten Proteine spiegelt die Komplexität der Interaktionen zwischen HIV-1 und Wirt wider, die die Bekämpfung des Virus durch das Immunsystem und therapeutische Interventionen so herausfordernd machen.

1.1.3. Replikationszyklus von HIV-1

Ein Großteil der HIV-1-Stämme nutzt das Oberflächenprotein gp120 zur Bindung an den CD4-Rezeptor und den β -Chemokin-Rezeptor CCR5 als Corezeptor (M-trope bzw. R5-trope Stämme), während eine kleinere Gruppe von Stämmen den α -Chemokin-Rezeptor CXCR4 bindet (T-trope bzw. X4-trope Stämme). Nach erfolgreicher Bindung übernimmt das Oberflächenprotein gp41 die Aufgabe, die virale und zelluläre Membran zur Fusion zu bringen, wodurch das Viruskapsid in die Zelle gelangt.

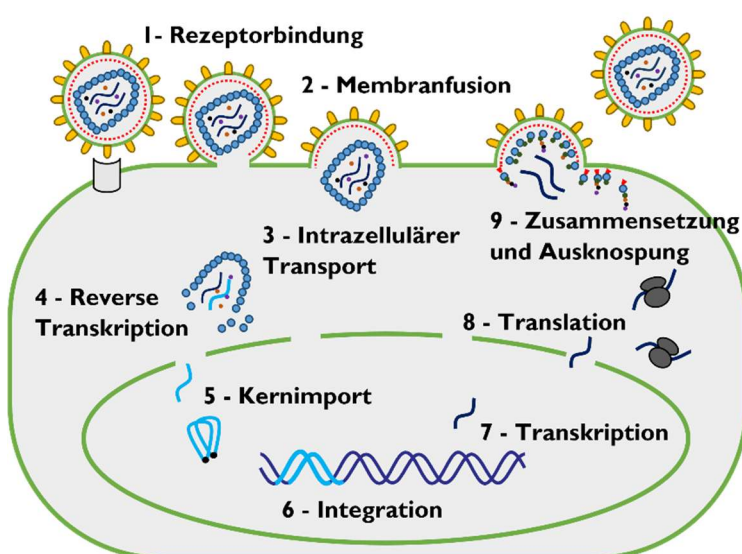


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Replikationszyklus von HIV-1. Nach der Rezeptorbindung (1) fusionieren die Membran von Virus und Zelle (2) und das Viruskapsid tritt in die Zelle ein (3). Die reverse Transkriptase schreibt die RNA des Virus in cDNA um (4), die in den Zellkern importiert (5) und dort durch die Integrase ins zelluläre Genom integriert wird (6). Die zelluläre Transkriptase (7) und die Ribosomen (8) produzieren daraufhin neue virale RNA und Enzyme, die sich an der Zellmembran sammeln, zusammensetzen und als neue Virus-partikel ausgeschieden werden (9) (eigene Darstellung nach (Fanales-Belasio et al. 2010; Woens 2018)).

Die virale RNA wird dort durch die viruseigene reverse Transkriptase in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Im Vergleich zur DNA-Replikation in Zellen, aber auch mit anderen viralen Polymerasen, zeichnet sich dieses Enzym durch seine hohe Fehleranfälligkeit aus (Roberts et al. 1988). Dazu trägt vor allem der Mangel einer Fehlerkorrekturfunktion bei (Abram et al. 2010). Die menschliche RNA-Polymerase II, die das integrierte Virusgenom zur Produktion neuer Viruspartikel transkribiert, hat eine ebenfalls schwach ausgeprägte Fehlerkorrekturfunktion, was in Kombination eine bemerkenswert hohe Mutationsrate ergibt. Je nach Studie und verwendeter Untersuchungsmethode werden in einem Replikationszyklus Fehlerraten zwischen 10^{-3} und 10^{-5} also alle 1.000-100.000 Basenpaare angegeben (Abram et al. 2010). Dies entspricht in etwa 0,1 bis 10 Punktmutationen je Virusgenom. Aufgrund der hohen Mutationsrate liegt HIV-1 in infizierten Personen als Quasispezies vor, also als dynamisches Ensemble genomisch ähnlicher, jedoch nicht identischer Virusvarianten (Tough und McLaren 2018). Gepaart mit der chronischen Natur der Infektion, die eine kontinuierliche Replikation ermöglicht, schafft die günstige Bedingungen

für die Entstehung von Resistenzmutationen. Zusammen mit dem Selektionsdruck durch antiretrovirale Medikation, insbesondere wenn diese aufgrund von mangelnder Patienten-Compliance oder suboptimaler Medikamentenauswahl nicht vollständig hemmend wirkt, kann die antivirale Wirkung von Therapeutika erheblich beeinträchtigt werden. Nach der reversen Transkription vermittelt der sogenannte Pre-Integrationskomplex, bestehend aus der reversen Transkriptase, der Integrase und weiteren Proteinen den Eintritt der DNA in den Zellkern, wo sie in das Wirtsgenom integriert wird. Hierdurch erreicht das Virus eine stabile Ablage seines Erbguts. Die so integrierte virale DNA, auch als Provirus bezeichnet, wird nachfolgend wieder von zellulären Transkriptionsfaktoren gelesen und in RNA transkribiert. Die verschiedenen Spleißvarianten dieser mRNA bilden die Grundlage für die Synthese der viralen Proteine. Diese sammeln sich gemeinsam mit dem vollständig transkribierten viralen RNA-Genom an der Zellmembran, bevor sie sich beim Ausknospen zu einem Viruspartikel zusammensetzen und abschnüren. Zu guter Letzt muss das neue Virus noch eine weitere Reihe proteolytischer Reifungsschritte durchlaufen, bevor es infektiös ist (Freed 2015).

1.1.4. Therapie von HIV-1 und AIDS

Die kontinuierliche Entwicklung von Therapeutika gegen HIV-1 seit der Entdeckung des Virus hat zu bedeutenden Fortschritten geführt. Heutzutage haben Patienten mit Zugang zur antiretroviralen Therapie eine breite Palette hochwirksamer Medikamente zur Verfügung, die bei richtiger Anwendung die Virusreplikation hemmen und die Entwicklung von AIDS verhindern. Diese Therapie ist oft so effektiv, dass die Viruslast auf nicht nachweisbare Werte absinkt, wodurch zudem eine Weitergabe des Virus über gängige Übertragungswege wie Geschlechtsverkehr oder Blut nahezu ausgeschlossen wird. Die Geschichte der antiretroviralen Medikamente begann mit dem Thymidinanalogon Zidovudin (Azidothymidin), einem nukleosidischen Inhibitor der reversen Transkriptase (NRTI), der die Umschreibung von RNA in DNA über das aktive Zentrum des Enzyms unterbindet. Zusätzlich zu den NRTIs wurden im Laufe der Zeit weitere Klassen antiretroviraler Therapeutika entwickelt, darunter Eintrittshemmer, Fusionsinhibitoren, nicht-nukleosidische reverse Transkriptase-Inhibitoren (NNRTIs), Integraseinhibitoren (INSTIs) und Proteaseinhibitoren (PIs). Eintrittshemmer stören die Bindung des Virus an den CD4-Rezeptor (Ibalizumab), CCR5-Corezeptor (Maraviroc) oder das gp120-Protein (Fostemsavir), während Fusionsinhibitoren die Zellmembranfusion nach der Bindung des Virus an die Wirtszelle blockieren (Enfuvirtide).

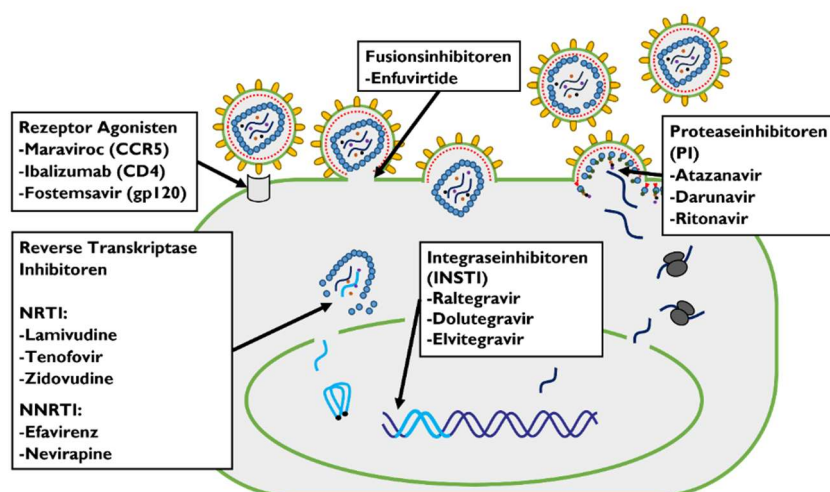


Abbildung 5: Targets zugelassener HIV-1-Therapeutika (Beispiele) im Replikationszyklus. Agonisten der Rezeptorbindung können den Rezeptor CD4, den Corezeptor CCR5 oder das Envelope-Protein gp120 binden. Fusionsinhibitoren verhindern die Membranfusion. Die Reverse Transkriptase kann von nukleosidischen Inhibitoren (NRTI) nicht-nukleosidischen Inhibitoren (NNRTI) inhibiert werden. Integrase-Strand-Transfer Inhibitoren (INSTI) verhindern die Integration der cDNA in das Wirtsgenom. Proteaseinhibitoren (PI) blockieren die Ausreifung des Viruspartikels. (eigene Darstellung nach (Fanales-Belasio et al. 2010; Woens 2018)).

Integraseinhibitoren blockieren die Integration des in cDNA überschriebenen Virusgenoms in die DNA der Wirtszelle. Alle derzeit zugelassenen Therapeutika dieser Klasse fallen in die Gruppe der sogenannten Integrase-Strand-Transfer-Inhibitoren. Diese verhindern die Integration über das aktive Zentrum der Integrase, indem sie mit dort für die Funktion des Enzyms notwendigen Mg^{2+} -Ionen interagieren. In der Entwicklung sind jedoch auch Substanzen mit anderen Wirkmechanismen wie der Inhibition des für die Integration notwendigen Molekülkomplexes oder der Störung der gerichteten Integration der viralen DNA in transkriptionell aktive Regionen des Wirtsgenoms. Proteaseinhibitoren fungieren als kompetitives Substrat, das das aktive Zentrum der Protease bindet und blockiert. Dazu gehören unter anderem Ritonavir, Atazanavir und Darunavir (Kräusslich und Bartenschlager 2008; Chang et al. 2010; Lv et al. 2015).

Als Reaktion auf die Resistenzentwicklung, die im Laufe der Behandlung auftreten kann, wurde mit der Verfügbarkeit von Therapeutika mit verschiedenen Wirkmechanismen die Kombinationstherapie (cART) eingeführt. Das Phänomen der Resistenzentwicklung ist bei HIV-1, wie bereits beschrieben, aufgrund der hohen Fehleranfälligkeit des Replikationsprozesses und der chronischen Natur der Infektion besonders bedeutsam. Eine Kombinationstherapie verringert die Chance einer erfolgreichen Resistenzentwicklung des Virus gegen die Therapie dramatisch, da gleich mehrere, möglicherweise miteinander inkompatible Mutationen unter gehemmter Replikation stattfinden müssen. Dies ist insbesondere bei den beiden Klassen von Molekülen, die auf die reverse Transkriptase des Virus einwirken, zu beobachten. Nukleosidische Inhibitoren der reversen Transkriptase, die

als nicht funktionale Nukleosidanaloga das aktive Zentrum des Enzyms blockieren, unterscheiden sich stark von ihrem Nicht-Nukleosidischen Gegenpart, der von außen auf die Struktur des Enzyms einwirkt. Zur Entstehung einer Resistenz müssten hier gleichzeitig das aktive Zentrum als auch die außenliegende Bindestelle mutieren. Diese Hürde ist rein mathematisch höher: selbst bei einer angenommenen maximalen Mutationsrate von 1:1000 ist eine Kombination von Punktmutationen an zwei spezifischen Basen um den Faktor 1000 unwahrscheinlicher als eine einzelne. Doch selbst in diesem seltenen Fall zeigt sich in der klinischen Praxis, dass einige Resistenzmutationen gegen NRTI die Suszeptibilität für NNRTIs erhöhen, die Effekte sich in diesem Fall also widersprechen, statt reine Synergien zugunsten einer Multiresistenz aufzuzeigen (Tozzi et al. 2004; Clark et al. 2006).

Antiretrovirale Therapie wird nicht nur nach Diagnose einer Infektion verschrieben, sondern kann auch präventiv eingenommen werden. Die sogenannte Präexpositionsprophylaxe (PrEP) wird seit 2015 von der WHO für Risikogruppen empfohlen und leistet einen wichtigen Beitrag zur Bekämpfung von HIV-1 (O Murchu et al. 2022).

1.1.5. Ziele der globalen Bekämpfung von HIV

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) hat umfassende Richtlinien für die weltweite Bekämpfung der HIV/AIDS-Pandemie entwickelt. Die Grundlage der weitreichenden Behandlungsziele wurde 2015 mit der Treat-All Maxime gelegt, nach der antiretrovirale Therapie für alle HIV-infizierten unabhängig ihrer CD4-Zelldichte empfohlen wurde (WHO 2015; Nash et al. 2018). Sie machte sich die zu diesem Zeitpunkt ausreichend breite Verfügbarkeit der Therapeutika zunutze und zielte auf eine Unterdrückung der Weitergabe des Virus. Dieser Ansatz war ein maßgeblicher Beitrag zur Verfolgung der 90-90-90 Zielmarke, die ursprünglich bis Ende 2020 angestrebt wurde (UNAIDS 90-90-90 2014). Diese Zielmarke setzte folgende Meilensteine: 90% aller HIV-infizierten Personen sollten diagnostiziert sein, 90% der diagnostizierten Menschen sollten Zugang zur antiretroviralen Therapie haben und 90% der Menschen in Behandlung sollten eine nicht mehr nachweisbare Viruslast aufweisen.

Bis September 2020, kurz vor der angestrebten 90/90/90-Frist, lagen die geschätzten Werte bei 81%/83%/88% bezogen auf die jeweiligen Zielvorgaben. Dies bedeutete eine Lücke von 3,3 Millionen Menschen zur Erreichung der 90%-Diagnoserate sowie jeweils 5,4 Millionen Menschen zur Erreichung der Therapie- und Suppressionsraten.

Die aktualisierten Ziele für das Jahr 2025 gingen noch einen Schritt weiter, indem sie das Ziel auf 95/95/95 erhöhten und gleichzeitig eine verstärkte Betonung auf die Erreichung dieser Quoten in allen Bevölkerungsgruppen legen.

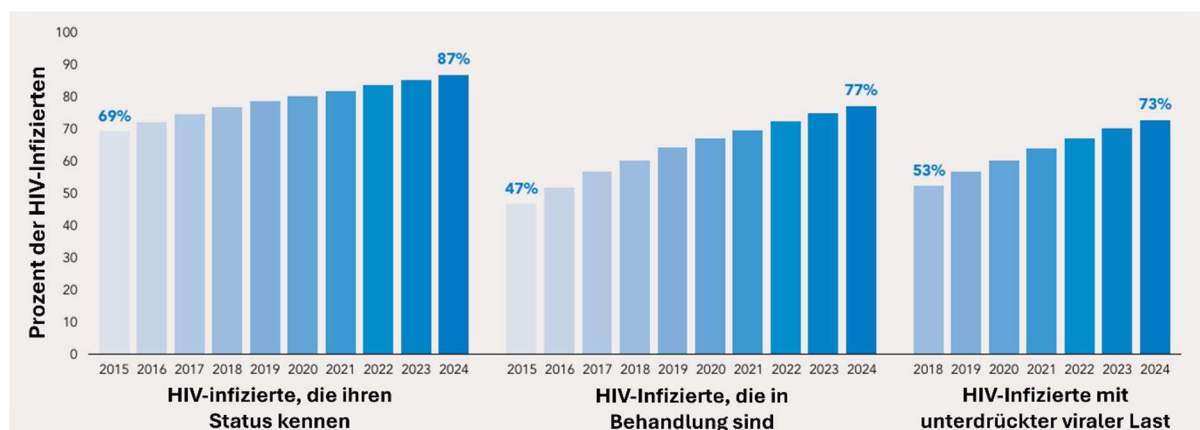


Abbildung 6: Visualisierung und Fortschritt beim Verfolgen der 95/95/95 Ziele. Die Detektion von HIV-Infizierten liegt mit 87% deutlich unter den angestrebten 95%. Die Behandlungsquote von HIV-Infizierten liegt bei 77% (<90% der entdeckten Infizierten) und die erfolgreiche Virussuppression beträgt 73%. Damit ist der Anteil der Menschen in Behandlung, die auch eine erfolgreich unterdrückte Viruslast haben, bei etwa 95% und entspricht dem Ziel. Die ersten beiden Zahlen liegen jedoch noch deutlich unter den für 95/95/95 notwendigen Werten (UNAIDS Update 2025)(eigene Übersetzung der Beschriftung).

Besondere Aufmerksamkeit wird dabei gefährdeten Gruppen gewidmet. Hierfür werden die bisherigen Parameter um Ziele bei der Bereitstellung sexueller und reproduktiver Gesundheitsdienste für Frauen im gebärfähigen Alter, der Suppressionsrate bei schwangeren und stillenden Frauen sowie der Verfügbarkeit von Präventionsmaßnahmen für Risikogruppen ergänzt. Dieser erweiterte Ansatz spiegelt das Bestreben wider, die HIV/AIDS-Epidemie in all ihren Facetten anzugehen und eine umfassende Gesundheitsversorgung sicherzustellen.

Die U.N. Sustainable Development Goals für das Jahr 2030 beinhalten das Ende von HIV/AIDS als Epidemie, wobei hiermit nicht die Ausrottung des Virus, sondern der Übergang von einer Epidemie zur Endemie gemeint ist, bei der die Anzahl der Infizierten je Region stabil oder sinkend ist, was bei einer chronischen Infektion wie HIV eine maximale Anzahl von Neuinfektionen in Höhe der (an beliebigen Ursachen) versterbenden HIV-Infizierten bedeutet (Assefa und Gilks 2020). Eine tatsächliche Ausrottung von HIV ist aufgrund dieser chronischen Natur ein absolutes Fernziel, dem aktuell keine konkreten Public-Health-Programme gewidmet sind. Eine Entwicklung, die dieses Ziel realistischer machen könnte, wäre eine Heilung oder Immunisierung gegen HIV, die nicht von der fortwährenden individuellen Compliance der Betroffenen abhängig ist.

1.1.6. Neue Ansätze der Therapie von HIV-1

Neben den bereits etablierten viralen Targets werden auch zelluläre Kofaktoren der Infektion, wie der "lens epithelium-derived growth factor" (LEDGF)/p75, die humane tRNA^{Lys3} oder Phosphatidylinositol-(4,5)-bis-Phosphat (PI(4,5)P₂) als Ziele für die Therapie erforscht (Shun et al. 2007; Gremminger et al. 2020; Waheed und Freed 2009). Ein Vorteil zellulärer gegenüber viralen Targets ist die ungleich geringere Mutationsrate und die fehlende Selektion zugunsten von Resistenzmutationen. Dem steht jedoch ein erhöhtes Risiko unerwünschter Nebenwirkungen gegenüber, da zelluläre Targets häufig essenzielle physiologische Funktionen erfüllen. Es existieren zwar in Entwicklung befindliche Therapeutika, die die Interaktion des Virus mit beispielsweise LEDGF/p75 angreifen, als gebundenes Target haben sie jedoch das daran beteiligte virale Enzym (Tocco et al. 2023).

Impfstoffe stellen die beste Option zur langfristigen und globalen Bekämpfung pandemischer Erreger dar. Seit Entdeckung des Virus werden daher auch für HIV-1 Impfstoffe erforscht und entwickelt. Diese scheitern jedoch bisher an der großen genetischen Variation von HIV-1 und seinen Fähigkeiten zur Immunevasion (Jones et al. 2020; Ng'uni et al. 2020; Kim et al. 2021).

Zuletzt existieren zell- und gentherapeutische Methoden, die auf eine Heilung von HIV-1 über eine Entfernung des CCR5-Corezeptors abzielen, der von den meisten HIV-1-Stämmen (M/R5-trope Stämme) zu Infektion genutzt wird (Awada et al. 2026). So konnten in der Vergangenheit bei einzelnen Stammzelltransplantationen Spender mit homozygoter $\Delta 32$ -Mutation im CCR5-Gen identifiziert werden (Hütter et al. 2009). Die $\Delta 32$ -Mutation reduziert beziehungsweise verhindert die Präsentation des Rezeptors an der Zellmembran, wodurch Menschen mit homozygoter CCR5- $\Delta 32$ -Mutation praktisch immun gegenüber M-tropen HIV-1-Stämmen sind. Neuere Fallberichte deuten darauf hin, dass unter spezifischen Voraussetzungen auch heterozygote CCR5- $\Delta 32$ -Spenden mit einer anhaltenden HIV-1-Remission assoziiert sein können (Gaebler et al. 2026). Bei den so erfolgten Immunisierungen gegen HIV-1 handelte es sich jedoch um Nebeneffekte einer durch Leukämie notwendigen Stammzelltransplantation. Wo eine solche primäre Indikation fehlt, ist ein so hoch invasiver und riskanter Eingriff aufgrund der Verfügbarkeit medikamentöser Behandlung von HIV-1 nicht angemessen. Auch gentherapeutische Methoden können den CCR5-Rezeptor theoretisch dauerhaft entfernen (Schwarze et al. 2021a; Schwarze et al. 2021b). Weder die

ex vivo Modifikation von autologen Immunzellen noch der Versuch, hämatopoetische Stammzellen in vivo zu editieren, zeigen bisher jedoch ausreichend hohe Erfolgsquoten. In Kombination mit dem hohen notwendigen Aufwand stellen sie (noch) keine Therapieform dar, die konventionelle cART sinnvoll ergänzen oder ganz ersetzen könnte (Moso et al. 2025). All diese Nachteile und Herausforderungen untermalen die unverändert hohe Priorität, die die Suche nach hochwirksamen antiretroviralen Wirkstoffen für die akute und langfristige Behandlung von HIV-Infizierten sowie die PrEP hat.

1.2. Die Covid-19 Pandemie

SARS-CoV-2 ist der für die Krankheit COVID-19 (Coronavirus disease 2019) und die gleichnamige 2019 ausgebrochene Pandemie verantwortliche Erreger (Zhou et al. 2020; Huang et al. 2020). Ausgehend von der chinesischen Region Wuhan entwickelte sich das Virus innerhalb weniger Wochen zu einer der größten globalen Gesundheitsherausforderungen. Bis zum Ende der durch die WHO ausgerufenen internationalen Gesundheitsnotlage im Mai 2023 gab es über 700 Millionen bestätigte Infektionen und über 7 Millionen Todesopfer, wobei von einer sehr hohen Dunkelziffer bei der Detektion und auch von einer höheren Anzahl tatsächlicher Todesopfer auszugehen ist (Mathieu et al. 2026; Karlinsky und Kobak 2021). SARS-CoV-2 verursacht trotz der global erfolgten Immunisierung durch Impfprogramme und erfolgte Infektionen auch nach Ende der globalen pandemischen Notlage noch regelmäßige Krankheitswellen, jedoch mit weitaus geringeren gesundheitlichen Folgen.

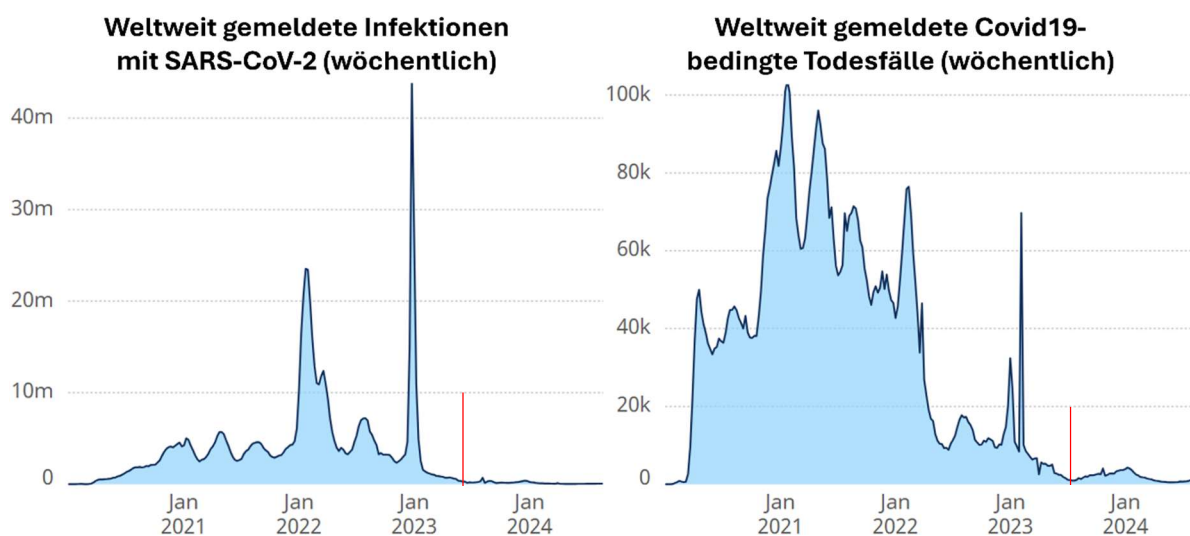


Abbildung 7: Weltweit gemeldete Infektionen mit SARS-CoV-2 und Covid19-bedingte Todesfälle (jeweils wöchentlich). Dargestellt sind die Zahlen bis 06/2024. Nach diesem Zeitpunkt blieben die global gemeldeten Todesfälle konstant unter 2000 pro Woche. Die rote Linie markiert das Ende des durch die WHO erklärten globalen Gesundheitsnotstandes im Mai 2023. Die tatsächlichen Zahlen sind aufgrund mangelnder Tests in der Frühphase und ausgesetzter Testvorschriften in der Spätphase vermutlich deutlich höher (WHO Covid-19 Dashboard 2026).

Neben den Kosten, die erforderliche Auffrischungsimpfungen und Krankheitsausfälle in Gesundheitssystem und Wirtschaft verursachen, stellen auch die individuellen Folgen der Infektion weiterhin ein relevantes Gesundheitsrisiko dar, besonders für vulnerable Gruppen. Auch wenn Fälle akuter, schwerer Lungenentzündungen durch die Immunisierung besonders effektiv eingedämmt werden, verbleiben Risiken für kardiovaskuläre und Organschäden sowie für eine Reihe postviraler Symptome (Gupta et al. 2025; Yet et al. 2026). Die Entwicklung von Impfstoffen gegen das neue Virus, einschließlich seiner aufgrund von Mutationen auftretenden Varianten, hat durch internationale Zusammenarbeit und die bahnbrechende Entwicklung der mRNA-Impfstofftechnologie enorme Fortschritte gemacht (Gote et al. 2023). Trotzdem besteht weiterhin Bedarf an Therapeutika für Menschen mit unzureichendem Immunschutz, wie Neugeborene, Immunsupprimierte und für die selten auch bei bestehendem Immunschutz auftretenden schweren Krankheitsverläufe (Galmiche et al. 2022). In den Anfangsphasen der Pandemie wurden vermehrt unspezifische Therapeutika eingesetzt, die darauf abzielten, überschießende Immunreaktionen zu mildern. Hierbei spielte vor allem das Kortikosteroid Dexamethason eine bedeutende Rolle, das über die intrazellulären Glucocorticoid-Rezeptoren Entzündungsprozesse hemmt (Namazi 2022; Kino et al. 2021). Mit zunehmendem Verständnis der Infektionsmechanismen verlagerte sich der Schwerpunkt auf gezieltere Therapieansätze, die den Infektionsverlauf und die spezifische Virusbiologie direkt angehen (Asselah et al. 2021; Li et al. 2023).

Eine wichtige Rolle bei der Suche nach Therapiemöglichkeiten spielte das sogenannte "Drug Repurposing", bei dem bereits zugelassene Medikamente auf ihre mögliche Wirkung bei mit SARS-CoV-2 infizierten Menschen untersucht wurden (Kuzikov et al. 2022). Ein noch spezifischerer Ansatz war die Entwicklung neutralisierender Antikörper und Nanobodies, die aus B-Zellen konvaleszenter Patienten isoliert oder gezielt durch künstliche Immunreaktionen in Labortieren erzeugt und aufgrund ihrer spezifischen Bindung an die Virusoberfläche und der Fähigkeit zur Neutralisation, also zur Blockade der Bindung an die Zellrezeptoren, selektiert wurden (Cao et al. 2020; Hurt und Wheatley 2021; Chiyyeadu et al. 2024). Letzteres Verfahren ist jedoch ein Wettlauf gegen die dynamische Entwicklung des Virus.

1.2.1. SARS-CoV-2 Infektion und Krankheitsverlauf

SARS-CoV-2 wird, wie alle Coronaviren, primär respiratorisch verbreitet. Im Gegensatz zu den meisten Vertretern seiner Art sind Erkrankte jedoch oft bereits vor dem Eintritt von

Symptomen oder trotz ausbleibender Symptome infektiös und die Übertragung findet nicht nur über Tröpfchen, sondern auch in relevantem Maße in Form von Aerosolen statt. Erkrankte sind in sehr unterschiedlichem Maße ansteckend, was in Kombination mit dem Potential der aerosolischen Übertragung eine starke Überdispersion des Virus und große Bedeutung von "Superspreading Events" zur Folge hat. Diese Faktoren sind entscheidend für seine starke Verbreitung und die Schwierigkeit der Eindämmung (Endo et al. 2020; Hart et al. 2021; Meyerowitz et al. 2021).

Eine Infektion mit Coronaviren, so auch SARS-CoV-2, löst zumeist erkältungsartige Symptome wie Husten, Fieber, Halsschmerzen sowie Gelenk- und Muskelschmerzen (Myalgie) aus (Fehr und Perlman 2015; Elrobaa und New 2021). SARS-CoV-2 kann darüber hinaus aber deutlich häufiger als die meisten Coronaviren zu atypischen, schweren Lungenentzündungen führen, die mit einer Schädigung des Lungenepithels und einer überschießenden Immunreaktion einhergehen können (Al-Jahdhami et al. 2022; Xu et al. 2020). Ein weiteres charakteristisches Symptom für eine Infektion mit SARS-CoV-2 ist der Verlust des Geschmacks- bzw. Geruchssinns (Eshraghi et al. 2020; Hannum et al. 2023). Schwere Verläufe zeichnen sich dabei auch durch eine Beteiligung weiterer Organe aus, darunter vor allem das kardiovaskuläre System (Rabaan et al. 2023; Kožlik et al. 2022; Pal et al. 2021). Auch gastrointestinale, nephrologische sowie neuropathologische Symptome wurden beobachtet (Galanopoulos et al. 2020; Welcome und Mastorakis 2021; Maiese et al. 2021).

Zusätzlich zur Schädigung durch die akute Infektion zeichnet sich SARS-CoV-2 durch eine ausgeprägte Anzahl postviraler Syndrome aus. Neben bleibenden respiratorischen, kardiovaskulären, neurologischen und gastrointestinalen Schäden aus der akuten Infektionsphase gehören dazu auch Phänomene, die sich erst nach der Infektion einstellen. Besonders hervorzuheben ist dabei die Myalgische Enzephalomyelitis/das Chronische Fatigue-Syndrom (ME/CFS), eine schwere Erkrankung, die sich primär in Form von Erschöpfung, Schlafstörungen, Schmerzen und kognitiver Einschränkung äußert (Xu et al. 2026). Das für schwere virale Erkrankungen nicht untypische Auftreten von postviraler Fatigue scheint bei diesem Virus besonders stark ausgeprägt und stellt mit etwa 40% das häufigste Symptom unter langfristig von Infektionsfolgen Betroffenen dar (Halas et al. 2025).

Die teils schweren und bleibenden Einschränkungen werden unter den Begriffen Post Covid (4-12 Wochen nach Infektion) und Long Covid (>12 Wochen nach Infektion) zusammengefasst

und sind nach wie vor Gegenstand aktiver Forschung Sie machen aufgrund der chronischen Natur auf lange Sicht einen hoch relevanten Anteil der durch die Pandemie ausgelösten Belastung für die menschliche Gesundheit aus (Yadav et al. 2026).

1.2.2. Ordnung von Coronaviren und SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 ist ein Virus der Familie der Betacoronaviren im Subgenus Sarbecoviren (SARS-related betacoronaviruses). Die Familie der Coronaviren, die zur Ordnung Nidovirales gehören, wurde erstmals 1966 identifiziert und wurde in verschiedenen (Nutz-)Tieren und Menschen nachgewiesen. Ihr Name leitet sich von den charakteristischen Spike-Proteinen auf ihrer Oberfläche ab, die unter dem Mikroskop an die Struktur der Sonnenkorona erinnern. Zu den endemisch zirkulierenden humanen Coronaviren (HCoV) gehören die Alphacoronaviren HCoV-229E und HCoV-NL63 sowie die Betacoronaviren HCoV-HKU1 und HCoV-OC43. Diese verursachen bei immunkompetenten Menschen, wie bereits beschrieben, zumeist milde Erkältungssymptome und zeigen ein saisonales Verbreitungsmuster (van der Hoek 2007).

Abseits dieser endemischen Erreger sind seit dem Beginn des 21. Jahrhunderts auch mehrere neue, von Tieren auf den Menschen übertragene Coronaviren aufgetreten, die schwerwiegende Atemwegssymptome verursachen. Das erste Virus dieser Art war das SARS-Coronavirus, das 2003 in China ausgebrochen ist (Drosten et al. 2003). Seitdem werden ähnliche Viren unter dem Begriff Sarbecoviren (SARS-assoziierte Betacoronaviren) zusammengefasst. Im Jahr 2012 gab es in Saudi-Arabien einen weiteren Ausbruch eines Sarbecovirus, das den Namen Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) erhielt (Azhar et al. 2019) Sowohl SARS-CoV als auch MERS-CoV waren hochpathogene Erreger, die glücklicherweise regional begrenzt werden konnten, dennoch führten sie zu jeweils etwa 800 Todesfällen (Feng und Gao 2007; Al-Omari et al. 2019).

SARS-CoV-2 trat Ende 2019 zum ersten Mal auf. Im Vergleich zu SARS-CoV und MERS-CoV verbreitete sich dieses Virus äußerst rasch. Die Nachverfolgung und Eindämmung wurden durch das häufige Ausbleiben von Symptomen während der frühen infektiösen Phase erschwert (Zhou et al. 2020; WHO 2020). Das Virus zeichnete sich zudem durch eine ausgeprägte Überdispersion und die Fähigkeit aerosolischer Transmission aus, was Großveranstaltungen eine besondere Rolle als potenziellen Superspreading-Events zukommen ließ (Endo et al. 2020; Wegehaupt et al. 2023). Trotz der im Vergleich zu SARS-

CoV und MERS-CoV geringeren individuellen Pathogenität brachte SARS-CoV-2 durch die schiere Masse an Infektionen die globalen Gesundheitssysteme an ihre Grenzen und tötete bis heute etwa 7 Millionen Menschen (Mathieu et al. 2026).

1.2.3. Virusbiologie von Coronaviren und SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 ist ein sphärisch aufgebautes Virus mit einem durchschnittlichen Durchmesser von etwa 100 nm (Ke et al. 2020; Zhu et al. 2020). Das Genom besteht aus einem einzelnen RNA-Strang mit positiver Polarität und ist mit etwa 29,9 kb Länge typisch für Coronaviren, die die längsten Genome aller RNA-Viren haben (NCBI-Genbank txid2697049, acc. 2024). Es besitzt eine 5'Cap und einen 3'Poly(A)-Schwanz, so dass es als mRNA für die Translation in der Wirtszelle fungieren kann (Hu et al. 2021).

Die genetische Struktur gliedert sich in sechs funktionale offene Leserahmen (Open Reading Frames, ORF): Replikase (ORF1a/ORF1b), Spike (S), Envelope (E), Membrane (M) und Nukleokapsid (N). Diese strukturellen Gene kodieren für Proteine, die essenziell für die Virusreplikation und -freisetzung sind. Etwa zwei Drittel des Genoms bestehen aus dem Replikase-Gen (20 kb, ORF1a/ORF1b). Die Translation von ORF1a resultiert zunächst im Polyprotein pp1a, welches im weiteren Verlauf in 11 nicht-strukturelle Proteine (NSPs) aufgespalten wird (Kim et al. 2020). ORF1b wird mittels ribosomalem Frameshift zum Polyprotein pp1ab translatiert, welches wiederum die Grundlage für 16 verschiedene nsps darstellt, die am Infektionszyklus im Wirt beteiligt sind (Gordon et al. 2020). Neben verschiedenen Steuerungssequenzen enthält ORF1a/ORF1b auch eine strukturierte, nicht translatierte Region (UTR), die an der RNA-Replikation, Transkription und der RNA-Synthese funktional beteiligt ist (Malone et al. 2022).

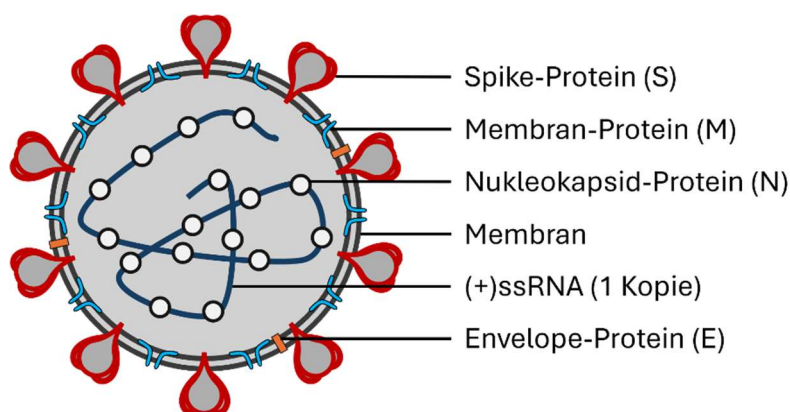


Abbildung 8: Schematischer Aufbau des SARS-Coronavirus. Auf der Membran des Virus sitzt das Spike-Protein (S), mit dem das Virus den ACE2-Rezeptor der Zielzelle bindet. Das Envelope-Protein (E) ist ein Transmembranprotein und Ionenkanal. Die Virusstruktur wird durch das Membran-Protein (M) und dessen Interaktion mit dem Nukleokapsid-Protein (N) stabilisiert. Letzteres schützt wiederum die virale RNA, die als +sense Einzelstrang vorliegt (eigene Darstellung nach (Pizzato et al. 2022)).

Das 150 kDa große Spike (S)-Protein auf der Virusoberfläche bindet an das Angiotensin-Converting-Enzym 2 (ACE2) auf der Wirtszelle und vermittelt so den Eintritt des Virus in die Zelle, was es zum wichtigen Target für neutralisierende Antikörper macht. Es ist aus der Rezeptorbindungsdomäne S1 und dem Stiel S2 zusammengesetzt, die im Verlauf der Bindung an den Rezeptor der Zielzelle an der Furinspaltstelle proteolytisch gespalten werden. Seine „Spike“-Form erhält es durch die Zusammensetzung als Homotrimer.

Die Membran des Virus wird durch das etwa 25-30 kDa große Membranprotein (M-Protein) strukturiert, das als Dimer die Krümmung und Bindung der Membran an das Nukleokapsid organisiert. Das Hüllprotein (Envelope, E-Protein) von SARS-Viren ist ein Transmembranprotein mit einer Größe von 8–10 kDa und fungiert unter anderem als Ionenkanal (Nieto-Torres et al. 2014). Das Nukleokapsidprotein (N-Protein) übernimmt mit seinen RNA-bindenden Eigenschaften die Verpackung des Genoms und stabilisiert durch Interaktionen mit dem M-Protein und dem Replikase-Transkriptase-Komplex die Virusstruktur (Cubuk et al. 2021; Hurst et al. 2009).

1.2.4. SARS-CoV-2 Zelleintritt und Replikation

Zum Verständnis des Infektionsablaufes und als Grundlage für die Entwicklung effektiver Impfstoffe und Therapeutika ist das Verständnis der Zellbindung und des Eintritts in die Wirtszelle wichtig. Die daran beteiligten viralen Moleküle und ihre bindingsrelevanten Epitope sind die Grundlage für Impfstoffe, die dem Körper die Produktion neutralisierender, also diese Bindung verhindernder, Antikörper ermöglichen. Die zellulären Oberflächenproteine können ebenfalls attraktive Targets für Therapeutika darstellen. In der Infektion spielt das Angiotensin-Converting-Enzym 2 (ACE2) an der Zelloberfläche eine entscheidende Rolle. Das Spike-Protein des Virus besitzt in seiner Untereinheit 1 (Subunit 1, S1) eine C-terminale Rezeptorbindungsdomäne (RBD), die mit hoher Affinität spezifisch an ACE2 bindet. Anschließend gibt es zwei verschiedene Abläufe des Zelleintrittes, deren relative Bedeutung sich im Laufe der Virusevolution mehrmals so verändert hat, dass der dominante Eintrittsweg zwischen ihnen gewechselt hat.

Der erste Eintrittsweg umfasst die direkte Fusion der Virusmembran mit der Zellmembran nach der Bindung des Spike-Proteins an hACE2 an der Zelloberfläche. Zur Fusion mit der Zellmembran benötigt es dabei einen proteolytischen Aktivierungsschritt, in dem das

Spikeprotein zwischen seiner ersten und zweiten Untereinheit gespalten wird (S1/S2 cleavage). Dieser Schritt wird von der ebenfalls membranständigen Transmembran-Serinprotease 2 (TMPRSS2) übernommen, sofern diese exprimiert wird (Koch et al. 2021).

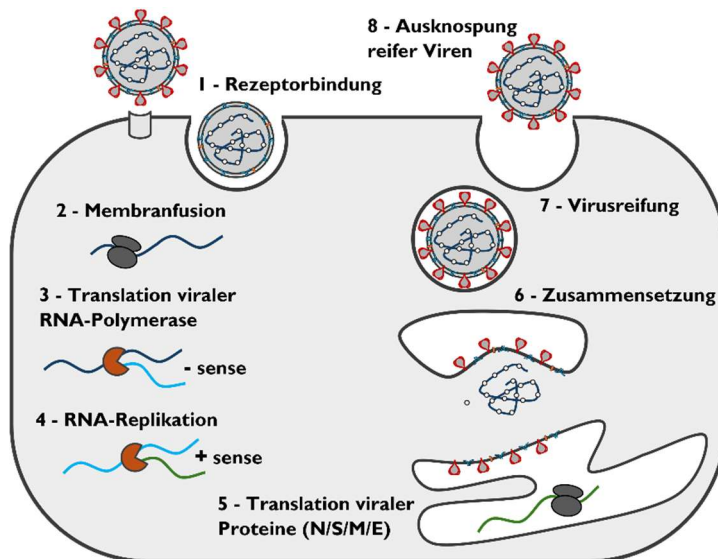


Abbildung 9: Schematischer Lebenszyklus von SARS-CoV-2 in infizierter Zelle. Nach der Rezeptorbindung (1) tritt das Virus über die Membranfusion oder einen endosomalen Pathway in die Zelle ein (2), wo die virale RNA-Polymerase direkt von der RNA translatiert wird (3). Diese schreibt daraufhin die virale +sense RNA zunächst in -sense-RNA um, die wiederum als Template für die Replikation des +sense-Genoms dient (4). Von diesem werden über diskontinuierliche Transkription und Translation die viralen Proteine exprimiert (5) und im Endoplasmatischen-Retikulum-Golgi-Interkompartiment (ERGIC) zu viralen Partikeln zusammengesetzt (6) um schließlich an der Zellmembran freigesetzt zu werden (7) (eigene Darstellung nach (Pizzato et al. 2022)).

Der zweite Eintrittsweg erfolgt bei fehlender TMPRSS2, ist aber auch unabhängig davon bei bestimmten Virusvarianten der dominante Pathway. Er beinhaltet die Aufnahme des Virus durch Endozytose, nachdem das Spike-Protein an hACE2 gebunden hat. Hierbei wird das Virus in intrazelluläre Vesikel aufgenommen, die dann mit lysosomalen Organellen fusionieren. Die saure Umgebung der Lysosomen aktiviert L-Cathepsin, das das Spike-Protein spaltet und den Eintritt des viralen Genoms in das Cytosol ermöglicht (Bayati et al. 2021).

Das einzelsträngige RNA-Virusgenom rekrutiert im Cytosol die Ribosomen der Wirtszelle und wird als mRNA in die Polyproteinuntereinheiten pp1a und pp1ab übersetzt. Diese ergeben wiederum 16 verschiedene Nichtstrukturproteine (NSPs), die mittels der in nsp3 codierten papain-like Protease und der in nsp5 codierten chymotrypsin-like Protease voneinander abgespalten werden. Die RNA-abhängige RNA-Polymerase NSP12 bildet das Herzstück des Replikase-Transkriptase-Komplexes (RTK), der sowohl die Replikation der genomischen RNA als auch die Transkription der subgenomischen mRNAs vermittelt (Malone et al. 2022).

Zur Unterstützung der RNA-Synthese und zur Umgehung der zellulären Immunantwort moduliert SARS-CoV-2 die Membranstruktur des endoplasmatischen Retikulums. Die entstehenden Strukturen werden als Replikationsorganellen beschrieben (Cortese et al. 2020; Snijder et al. 2020). Die S-, E- und M-Proteine werden durch ein komplexes System

diskontinuierlicher Transkription und Translation generiert und im modulierten ER bzw. dem ERGIC (Endoplasmatisches-Retikulum-Golgi-Interkompartiment) mithilfe des N-Proteins zu viralen Partikeln verpackt. Schließlich werden diese zur Zelloberfläche transportiert, wo sie durch Abkapselung von der Membran freigesetzt werden (Malone et al. 2022).

1.2.5. Virusevolution und Varianten

Im Verlauf der Pandemie hat SARS-CoV-2 vielfältige Mutationen akquiriert, die in der Entstehung von Virusvarianten mit unterschiedlichen Charakteristika resultierten. Auch wenn das Virus bei seiner Replikation im Unterschied zu HIV und vielen anderen RNA-Viren eine Proofreading-Funktion in Form der Exoribonuklease hat, führte die schiere Anzahl an Infektionen und damit verbundenen Replikationen zu einer großen Zahl von Mutationen. Zu den Mutationen mit dem größten Einfluss auf den Verlauf der Pandemie und die globalen Gesundheitssysteme gehören dabei Veränderungen in der Transmissibilität, der Pathogenität und der Immunflucht (Thakur et al. 2022).

Die erste epidemiologisch relevante Mutation, der Aminosäureaustausch D614G im Spikeprotein (Variante B.1), geschah bereits in den ersten Wochen der Verbreitung und fand außerhalb der Fachwelt wenig Beachtung (Korber et al. 2020). Darauf folgten Varianten, die von der WHO als “variants of concern” (VOC) deklariert und mit spezifischen Namen versehen wurden. Zu den global relevantesten dieser Varianten gehören die im Dezember 2020 entdeckte Alpha-Variante (B.1.1.7), die im April 2021 entdeckte Delta-Variante (B.1.617.2) und die im November 2021 entdeckte Omikron-Variante (B.1.1.529), deren Auftreten jeweils mit heftigen Steigerungen der Infektionsdynamik einhergingen und weltweite Infektionswellen auslösten (Choi und Smith 2021). Dabei zeichneten sich Alpha und Delta primär durch stark gesteigerte Transmissionscharakteristika aus, während mit Omikron die erste Variante mit hohem Grad an Immunflucht gegenüber der bis dahin etablierten Bevölkerungsimmunität auftrat (McLean et al. 2022; Harvey et al. 2021).

Die Pathogenität der Varianten variierte und unterlag keiner linearen Entwicklung. Während Alpha und Delta jeweils eine deutliche Steigerung der Pathogenität aufwiesen, war bei der Omikron-Variante eine im Vergleich zur zuvor dominanten Delta-Variante verringerte Fusogenität und damit einhergehend verringerte Pathogenität zu verzeichnen (Suzuki et al. 2022).

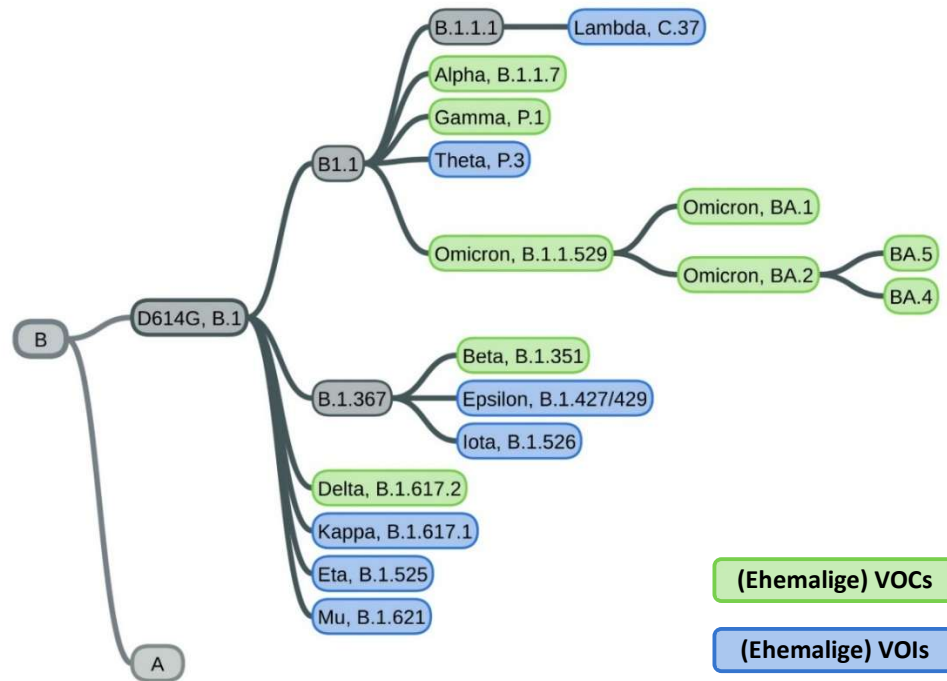


Abbildung 10: Phylogenetischer Baum der wichtigen SARS-CoV-2 Varianten. Dargestellt sind Varianten vom Wildtyp bis zu den Omikron-Subvarianten BA.1-BA.5, den letzten für die hier beschriebenen Versuche relevanten Varianten, die offiziell als "Variants of Concern" klassifiziert wurden. Variants of Interest sind beobachtete Varianten, die (noch) nicht den Status „Variants of Concern“ verliehen bekommen haben.

Dabei ist es wichtig anzumerken, dass es keine direkte phylogenetische Verbindung von einer dominanten Variante zur chronologisch nächsten geben muss. Gerade Omikron ist nicht in direkter Nachfolge von Delta entstanden, sondern vermutlich aus einer früheren Variante. Es gilt mittlerweile als wahrscheinlich, dass größere Sprünge in den akquirierten Mutationen zwischen den Varianten nicht einfach von der genomischen Surveillance unbemerkt graduell in der Transmission von Wirt zu Wirt passiert sind. Im Gegenteil scheinen besonders immunsupprimierte Patienten mit chronischer Infektion das ideale Umfeld zu gradueller Anpassung und Optimierung der Infektions- und Immunflucht-Eigenschaften darzustellen (Choi et al. 2020; Kemp et al. 2021). In diesen trifft die permanent erfolgende Replikation des Virus mit den resultierenden Replikationsfehlern auf ein immunologisches Umfeld, das ausreicht, um durch seine Aktivität sowohl den Wirt am Leben zu erhalten als auch einen konstanten Selektionsdruck zu erzeugen, ohne dabei die Persistenz der Infektion und damit die Anzahl an Replikationsereignissen kritisch zu verringern. So kann sich eine bekannte Variante über mehrere Wochen oder Monate innerhalb desselben Patienten eine Vielzahl an Mutationen aneignen, um dann bei der Weitergabe von diesem Patienten scheinbar aus dem Nichts als neue Variante ohne bekannte Zwischenschritte auf dem Radar der globalen Genom-Surveillance aufzutauchen (Avanzato et al. 2020; Cele et al. 2022).

1.2.6. Therapie von SARS-CoV-2

Die Therapie von SARS-CoV-2 ist ein komplexes Feld, das in seiner Entwicklung von der rasanten Ausbreitung des Virus sowie seiner konstanten Mutation und Anpassung geprägt wurde und wird (Li et al. 2023). Die Wirkmechanismen potenzieller Therapeutika für Covid-19 sind vielfältig und müssen sich den Veränderungen von Virus und Wirtspopulation anpassen. Eine Möglichkeit, den langwierigen Prozess der de-novo Entwicklung von Therapeutika zu umgehen, ist das sogenannte Drug-repurposing. Dabei werden Wirkstoffe, die bereits eine Zulassung für bestehende Indikationen besitzen, auf ihre Wirksamkeit in einem neuen Kontext – hier Covid-19 – untersucht (Pushpakom et al. 2019). Dies eröffnet die Möglichkeit, auf bereits bestehende Sicherheitsdaten, Formulierungen, Produktions- und Verteilungsketten zuzugreifen, sollte sich eine Wirksamkeit herausstellen. Wichtig ist hierbei selbstverständlich, dass die in Wirksamkeitsstudien gefundenen Dosen den bereits zugelassenen Rahmen nicht verlassen, da sonst eine erneute Sicherheitsüberprüfung erfolgen muss.

Eine der ersten erfolgreichen Therapien bestand in der Anwendung von Dexamethason, einem Kortikoid, welches die Immunreaktion dämpfte (Kino et al. 2021). Dies fand seine Anwendung vor allem bei immunnativen Patienten mit überschießender Immunreaktion und verlor entsprechend mit Einsetzen der Impfkampagne und dem abnehmenden Anteil immunnativer Patienten an Bedeutung.

Ein weiteres Beispiel ist das antivirale Therapeutikum Remdesivir, das ursprünglich zur Behandlung von Ebola entwickelt worden war und als Nukleotidanalogen bereits breite Wirksamkeit gegen verschiedene RNA-Viren, auch Coronaviren, gezeigt hatte (Sheahan et al. 2017; Siegel et al. 2017). Es wurde 2020 für die Behandlung von Covid-19 Patienten zugelassen und konnte aufgrund der bereits weit vorangeschrittenen Entwicklung und Untersuchung schnell zur klinischen Anwendung gebracht werden (Lamb 2020). Es sollte sich im weiteren Verlauf jedoch als vermutlich nur gering oder nicht wirksam in der Vermeidung schwerer Fälle von Covid-19 erweisen (Grundeis et al. 2023).

Ebenfalls zum Teil ein Ergebnis von Drug-Repurposing ist das Kombinationspräparat Paxlovid, das seit 2022 zum Einsatz kommt. Es besteht zum einen aus dem neu entwickelten, SARS-CoV-2 spezifischen Wirkstoff Nirmatrelvir, der die 3C-ähnliche Protease (3CL^{Pro}, NSP5) hemmt

und zum anderen aus dem HIV-1-Therapeutikum Ritonavir (Marzi et al. 2022; Zheng et al. 2023; Hashemian et al. 2023).

Patienten mit geschwächtem Immunsystem können gerade in der Frühphase der Infektion von einer Transfusion mit rekonvaleszentem Plasma bereits genesener Covid-19-Patienten profitieren. Bei immungesunden Patienten ist der Nutzen eingeschränkt und das gleicht den Aufwand und das Risiko einer allergischen Reaktion auf die transfusionsmedizinische Behandlung nicht aus (Peng et al. 2021; Fung et al. 2021).

Eine noch stärker vom Pandemieverlauf und vor allem der Virusevolution abhängige, entsprechend oft kurzlebige Klasse von Therapeutika ist die Gruppe der monoklonalen Antikörper (Hurt und Wheatley 2021). Dabei handelt es sich um aus konvaleszenten Patienten isolierte oder in Versuchstieren generierte Antikörper, die Patienten akut wie auch prophylaktisch verabreicht werden können, um zirkulierendes Virus zu neutralisieren, indem mit der Wirtszelle interagierende Epitope gebunden und blockiert werden (Cowan et al. 2023; Cao et al. 2020). Aufgrund ihrer hochspezifischen Bindung an die Oberfläche des beständig mutierenden Virus sind sie besonders stark von den Immunflucht-Mutationen betroffen, die das Virus als Antwort auf die bestehende Immunität der Wirtspopulation entwickelt. Dies gilt vor allem im Gegensatz zur wirtseigenen Immunität, die sich auf eine größere Breite neutralisierender Antikörper stützt, sich in immunkompetenten Patienten dynamisch an die jeweils vom Virus präsentierten Epitope anpassen kann und mit der T-Zell-vermittelten Immunität einen weiteren Abwehrmechanismus besitzt (Sette und Crotty 2021). Währenddessen müssen monoklonale Antikörper regelmäßig aufgrund mangelnder Wirksamkeit aufgegeben werden, wenn eine neue Virusvariante mit entsprechenden Veränderungen am gebundenen Epitop dominant wird und die bisherige ablöst.

1.3. Lentivirale Vektoren

Natürlich vorkommende Viren sind evolutionär auf die Übertragung ihres genetischen Materials optimiert. Jahrzehnte der virologischen Forschung haben nicht nur zu Strategien zu ihrer Abwehr geführt, sondern auch die Möglichkeit eröffnet, diese Eigenschaft für biotechnologische Anwendungen zu nutzen. Durch gentechnische Modifikation sind virale Vektoren erzeugt worden, die ein vielseitiges und effizientes Werkzeug zur genetischen Modifikation von Zellen für therapeutische und diagnostische Zwecke darstellen. Besonders hervorzuheben sind die in dieser Arbeit verwendeten, von HIV-1 abgeleiteten lentiviralen Vektoren, die eine Reihe vorteilhafter Eigenschaften kombinieren, darunter die Fähigkeit zuverlässiger Transduktion verschiedenster Zelltypen unabhängig von deren Proliferationsaktivität und eine stabile Integration in deren Genom. Im Vergleich zu anderen viralen Vektoren haben sie darüber hinaus eine hohe Verpackungskapazität von etwa 9 kb (Naldini et al. 1996; Wang et al. 2021).

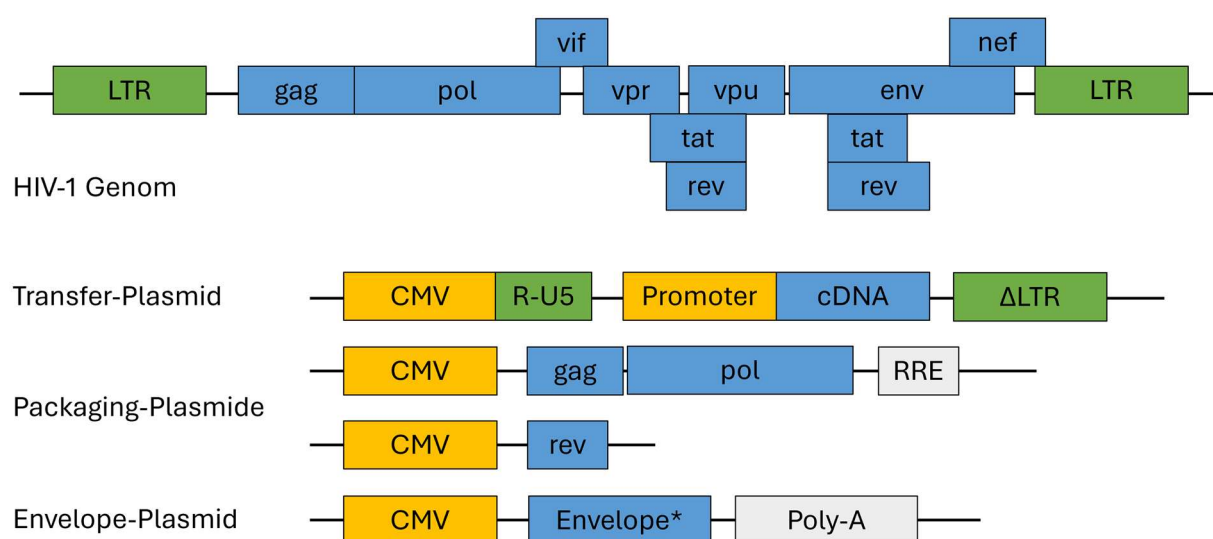


Abbildung 11: Aufteilung der zur Vektorproduktion notwendigen lentiviralen Gene im lentiviralen Vektorsystem der dritten Generation. *Das Envelope-Plasmid kann je nach gewünschtem Tropismus angepasst werden (Dull et al. 1998). LTR: long terminal repeats, gag: group specific antigen, pol: polymerase, vif: viral infectivity factor, vpr: viral protein R, tat: trans-activator of transcription, rev: regulator of expression of virion proteins, vpu: viral protein U, env: envelope, nef: negative regulatory factor, CMV: cytomegalovirus promoter, RRE: rev response element, Poly-A: poly-adenylation signal.

Lentivirale Vektoren der dritten Generation zeichnen sich dabei nicht nur durch breite und vielfältige Anwendbarkeit aus, sondern erfüllen auch hohe Sicherheitsstandards. In der Anwendung des sogenannten Split-Packaging-Systems werden Vektorpartikel aus vier verschiedenen Plasmiden generiert, die nur die notwendigen Gene für die Produktion der Viruspartikel und die Transduktion der Zielzellen enthalten. Die Expression viraler Gene, die zu Virulenz oder replikationskompetenten Viruspartikeln führen könnte, wird so

ausgeschlossen. Die Aufteilung der vorhandenen Gene auf verschiedene Plasmide und die Nutzung von Codon-Variationen macht zudem eine Rekombination zu Replikationskompetenten Viren so gut wie unmöglich und erleichtert gleichzeitig den Austausch einzelner Bestandteile wie des viralen Envelopes. Erst bei der gemeinsamen Anwesenheit der benötigten Plasmide in den Produzentenzellen, üblicherweise HEK293T, können die Partikel entstehen (Dull et al. 1998). Selbst gegen die Interaktion mit anderem genetischem Material in der Zielzelle, wie intakten HIV-Genomen, sind moderne lentivirale Vektoren abgesichert. Hierfür sorgt eine Deletion von Promotor und Enhancer in der 3'LTR-Region, die während der reversen Transkription auf die 5'LTR übertragen wird und so die Transkription funktionaler RNA-Genome durch diese sogenannte Selbstinaktivierung (SIN) verhindert. Lentivirale Vektoren werden seit mehr als zwei Jahrzehnten in der Forschung und klinischen Studien verwendet (Bartosch und Cosset 2004). So wurden bereits mehrere Therapeutika auf Basis von mit ihnen hergestellten CAR-T-Zellen und Stammzellpräparaten zugelassen. (Tabelle 1).

Tabelle 1: Gen- und Zelltherapien auf Basis lentiviraler Vektoren (PEI Online 2024). *Vertrieb und Zulassung von Zynteglo und Skysona in der EU wurden 2021 wieder eingestellt.

Produkt (EMA-Zulassung) Wirkstoff	Exprimiert	Indikation	Zielzellen	Hersteller
Kymriah (2018) <i>Tisagenlecleucel</i>	CD-19 CAR	CD19* B-Zell akute Lymphatische Leukämie (ALL) und diffuses großzelliges B-Zell Lymphom <25y	T-Zellen	Novartis
Zynteglo (2019*) <i>Betibeglogene autotemcel</i>	Globin- β Subunit	Beta-Thalassämie	CD34 ⁺ -Zellen	Bluebird Bio
Libmeldy (2020) <i>Atidarsagen autotemcel</i>	Arylsulfatase A	Metachromatische Leukodystrophie (MLD) bei Kindern	CD34 ⁺ -Zellen	Orchard Therapeutics
Skysona (2021*) <i>Elivaldogene autotemcel</i>	ABCD1	Zerebrale Adrenoleukodystrophie (CALD) bei Kindern <18 Jahren	CD34 ⁺ -Zellen	Bluebird Bio
Abecma (2021) <i>Idecabtagene vicleucel</i>	BCMA-CAR	Refraktäres multiples Myelom	T-Zellen	Bristol-Myers Squibb
Breyanzi (2022) <i>Lisocabtagene maraleucel</i>	CD19-CAR	B-Zell Lymphome (DLBCL, HGBL, PMBCL oder FL3B)	T-Zellen	Bristol-Myers Squibb
Carvykti (2023) <i>Ciltacabtagene autoleucel</i>	BCMA-CAR	Rezidives und refraktäres multiples Myelom	T-Zellen	Janssen-Cilag

Außerhalb der therapeutischen Verwendung sind lentivirale Vektoren aufgrund ihrer Fähigkeit zum sicheren und stabilen Transfer von genetischem Material ein wichtiger Bestandteil verschiedenster Forschungsfelder. Sie können zur (Über-)Expression oder Herunterregulation von Genen durch den Transfer von cDNAs oder shRNAs verwendet werden, was breite Anwendung in der biomedizinischen und zellbiologischen Forschung findet (Weber et al. 2008; Seifert et al. 2024; Enk et al. 2024). Sie können mit einer Reihe

unterschiedlicher viraler Envelopes ausgestattet (pseudotypisiert) werden, was eine Anwendung auf verschiedenen Zielzellen ermöglicht. Diese Pseudotypisierung ermöglicht auch die Erforschung des Envelopes und seiner Interaktion mit der Zielzelle selbst, wie nachfolgend ausführlicher beschrieben. Zur Markierung transduzierter Zellen steht eine Reihe verschiedener Mechanismen zur Verfügung, darunter fluoreszente Proteine wie das *enhanced Green Fluorescent Protein* (eGFP), Reportergene wie Luciferase oder Resistenzgene wie gegen Puromycin, die Markierung und Selektion in einem ermöglichen. Mit diesen Mitteln können verschiedene Gene, auch simultan, untersucht werden (Weber et al. 2008; Weber et al. 2010).

Lentivirale Vektorsysteme können auch für die stabile Markierung von Zellen eingesetzt werden, wodurch eine eindeutige Identifikation bis hin zu Einzelzellen in Tumormodellen und der regenerativen Medizin ermöglicht wird, sei es durch die Expression verschiedener Fluoreszenzproteine, das DNA-Barcoding oder das Optical-Barcoding (Weber et al. 2011; Cornils et al. 2014; Mohme et al. 2017). In proliferierenden Zellpopulationen wie Tumoren oder Stammzellen kann so auch die Klonalität von Zellen während des Wachstums und der Regeneration nachverfolgt werden. Die Markierung und Nachverfolgung ist dabei nicht nur auf die in vitro Anwendung oder die Transplantation in vivo beschränkt. Eine direkte Injektion lentiviraler Vektoren kann zur Markierung von beforschten Zellen in vivo genutzt werden und erlaubt die Beobachtung des individuellen Schicksals von Zellen inklusiver der räumlichen Dynamiken (Gomez-Nicola et al. 2014; Liang et al. 2016; Roh et al. 2018).

Die vorliegende Arbeit demonstriert, wie lentivirale Vektoren in einem zellbasierten Assay genutzt werden können, um tiefere Einblicke in die Mechanismen zweier global bedeutender Viren, HIV-1 und SARS-CoV-2, zu gewinnen. Die Modularität des Vektorsystems wird durch die wiederholte Modifikation des Envelopes und der viralen Enzyme belegt. Gleichzeitig werden mit der Erforschung zweier hochpathogener Viren unter BSL-2 Bedingungen die wertvollen Sicherheitsvorteile der Methode unterstrichen.

1.3.1. Zellbasierte Assays in Forschung und Wirkstoffentwicklung

Biochemische und molekularbiologische Assays sind integraler Bestandteil der frühen Phase der Entwicklung neuer Therapeutika, bevor komplexe und vor allem teure Versuche an Tiermodellen und klinische Studien angewendet werden. Während rein biochemische Assays

auf die Untersuchung isolierter Molekülstrukturen beschränkt sind, können zellbasierte Assays die Komplexität eines lebenden Systems abbilden und eine realistischere Einschätzung der biologischen Aktivität sowie erste Hinweise auf Toxizität geben (Blay et al. 2020). Sie ermöglichen das Screening von großen Substanzbibliotheken ohne eine vorherige Kenntnis der eigentlichen Zielstrukturen oder Wirkmechanismen und können in modifizierter Form zur weiterführenden Analyse verwendet werden (Powell et al. 2016). Gerade dieser Aspekt macht zellbasierte Assays dabei auch für die Grundlagenforschung wertvoll, da sich die Funktion von intrazellulären Prozessen und deren Beeinflussung untersuchen lässt. Während die Abbildung der molekularen Umgebung ganzer Zellen ein Vorteil gegenüber biochemischen Assays darstellt, ist die Möglichkeit der Verwendung humaner Zellen auch ein analytischer Vorteil gegenüber Tiermodellen. Gerade für Wirkstoffinteraktionen mit der Zellbiologie und in der Forschung an infektiösen Partikeln mit ihren vielfältigen zellulären Interaktionspartnern ist dies ein unschätzbarer Vorzug (Michelini et al. 2010). Die im zellbasierten Assay vorhandenen menschlichen Proteine bedeuten beispielsweise auch, dass Off-Target-Effekte genauer nachvollzogen werden können. In Zellkulturen kann ebenfalls die langfristige Wirkung von Substanzen unter anderweitig konstanten Bedingungen untersucht werden, was weder in den weniger komplexen und kurzlebigen biochemischen Assays noch in den oft durch Lebens- und Haltungsbedingungen begrenzten Tierversuchen möglich ist.

Zellbasierte High-Throughput-Screenings (HTS) ermöglichen die parallele Untersuchung einer großen Anzahl von Substanzen in kurzer Zeit (An und Tolliday 2010; Powell et al. 2016). Dies beschleunigt die Identifizierung vielversprechender Wirkstoffkandidaten erheblich und reduziert die Kosten und den Zeitaufwand in den frühen Phasen der Arzneimittelentwicklung. Im automatisierten Prozess eines HTS können auch mehrere Substanzen in Kombination angewendet werden (Multiplexing) und so mögliche Wechselwirkungen untersucht werden (Michelini et al. 2010). Dabei ist vorausgesetzt, dass der Assay eine ausreichende Signalstärke und zuverlässige Abgrenzung vom Signalhintergrund liefert. Der üblicherweise zur Evaluation solcher Assays verwendete Parameter ist der Z' -Wert, welcher sowohl die Differenz des durchschnittlichen Signals vom Hintergrund als auch die Varianz der beiden Werte einbezieht und bei hochwertigen Assays zwischen 0,5 und 1 liegen sollte (Zhang et al. 1999; Malo et al. 2006).

1.3.2. Pseudotypisierung lentiviraler Vektoren

Zur Nutzung auf einer möglichst großen Bandbreite an Zielzellen werden lentivirale Vektoren mit verschiedenen viralen Hüllproteinen pseudotypisiert (Cronin et al. 2005). Dabei spielen vor allem die Hüllproteine des ecotropen Moloney Mouse Leukemia Virus (eco-MLV) und des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV) eine wichtige Rolle. Während die verschiedenen Hüllproteine die Bindung an Zellrezeptoren und die Aufnahme der Partikel verändern, bleiben die anderen Funktionen und Bestandteile des viralen Lebenszyklus unbeeinflusst. Nach der Aufnahme des Vektors in der Zelle verbleiben nur das von HIV-1 abgeleitete RNA-Genom und die Proteine/Enzyme, die analog zu einer HIV-1 Infektion ihre Funktion ausführen.

Eine Pseudotypisierung kann neben der optimierten Transduktion von Zellen auch die Erforschung bestimmter viraler Hüllproteine und ihrer Interaktion mit zellulären Oberflächenproteinen zum Zweck haben. Hierzu können die Hüllproteine einer großen Zahl behüllter Viren verwendet werden, zum Teil in modifizierter Form, wie bei der später in dieser Arbeit beschriebenen d18/19-Deletion im SARS-CoV-2-Spikeprotein (Joglekar und Sandoval 2017; Kretschmer et al. 2020). Die Bindung des Virus an Zellrezeptoren ist der zentrale erste Schritt des Zelleintrittes und zudem aufgrund ihres Geschehens außerhalb der Wirtszelle ein attraktives und zugängliches Target für infektionshemmende Therapeutika. Auch für die Untersuchung neutralisierender Antikörper ist dieser Schritt wichtig, da diese für den Zelleintritt notwendige Virusepitope binden und so die Infektabwehr unterstützen. Durch die Pseudotypisierung mit dem Hüllprotein eines bestimmten Virus können Neutralisationsassays entwickelt werden, die sowohl eine Überprüfung der Wirksamkeit verschiedener Therapeutika (Entry-Inhibitoren) als auch die Untersuchung synthetisch hergestellter oder aus Plasma gewonnener neutralisierender Antikörper ermöglichen.

1.3.3. HIV-1 Pseudovirusassay

Lentivirale Vektoren replizieren zentrale Aspekte des Infektionszyklus von HIV-1. Die Rezeptorbindung wird aufgrund der Pseudotypisierung mit anderen viralen Hüllproteinen nicht imitiert. Die Membranfusion und das intrazelluläre Trafficking können abhängig von der Hüllprotein/Rezeptorkombination dargestellt werden, da Retroviren wie HIV-1 und MLV einen pH-unabhängigen, rezeptorvermittelten Pathway nutzen, während VSV beispielsweise auf das endosomale System der Zelle angewiesen ist. Die Prozesse der reversen Transkription,

des Kernimportes und der Integration der cDNA in das zelluläre Genom finden analog zur HIV-1 Infektion statt. Diese Prozesse und die für sie zentralen Enzyme reverse Transkriptase und Integrase sind die gängigsten Targets für antiretrovirale Therapeutika und von besonderem Interesse. Eine Expression viraler Proteine findet nicht statt und die Entstehung neuer (pseudo-)viraler Partikel ist ausgeschlossen. Stattdessen können wie beschrieben Marker zur zuverlässigen Nachverfolgung der Transduktion exprimiert werden (Abbildung 12).

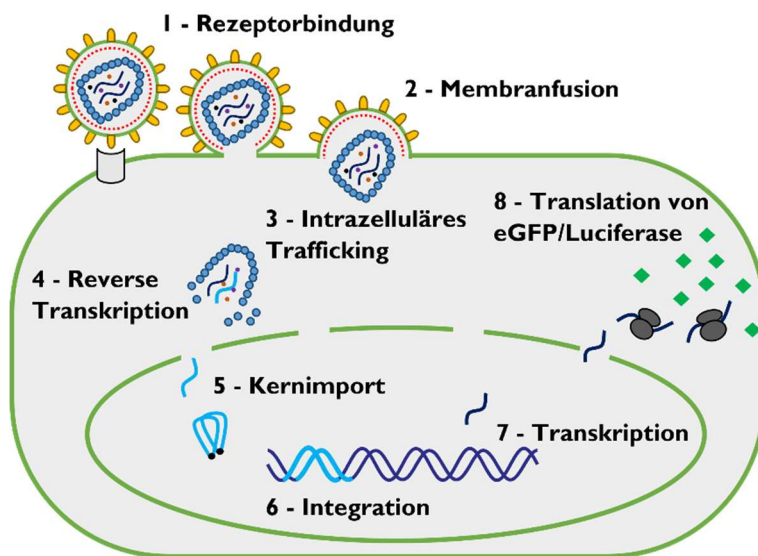


Abbildung 12: Imitation des HIV-1 Lebenszyklus durch lentivirale Vektoren. Nach der von der Pseudotypisierung abhängigen Rezeptorbindung (1), repliziert der Vektor den HIV-1-Lebenszyklus bis Integration der cDNA in das Wirtsgenom. Von der Membranfusion (2) über den intrazellulären Transport (3), die reverse Transkription der RNA in cDNA (4), deren Transport in den Zellkern (5) und die Integration in das Wirtsgenom (6) sind die HIV-1-eigenen Enzyme und Prozesse aktiv. Transkribiert (7) und translatiert (8) werden jedoch nur die im Transferplasmid dem Vektor eingefügten Proteine, im beschriebenen Assay vor allem Marker wie eGFP oder Luciferase (8). Es entstehen keine neuen Viruspartikel (eigene Darstellung nach (Fanale-Belasio et al. 2010; Weber et al. 2011; Woens 2018)).

Der Assay lässt sich mit geringem finanziellem Aufwand durchführen und bietet innerhalb von 2-3 Tagen nach dem Ansetzen ein eindeutig auszulesendes Signal. Gleichzeitig kann er aufgrund der hohen Sicherheitsstandards lentiviraler Vektoren in S1/S2-Laboren verwendet werden. All diese Umstände machen lentivirale Vektoren zu einem attraktiven Modell zur Erforschung der Interaktion von HIV-1 mit Wirtszellen. Dies beinhaltet auch Modifikationen, wie die Beschränkung des Infektionszyklus auf einzelne Abschnitte wie die reverse Transkription oder Integration, oder den Einfluss von (Resistenz-)Mutationen auf das Virus. Der in dieser Arbeit vorgestellte Assay wurde mit einem Fokus auf die Möglichkeit dieser Anpassungen entwickelt. Der Assay basiert auf dem LeGO-Vektor System und nutzt eGFP- sowie Luciferin- exprimierende lentivirale Vektoren der dritten Generation (Weber et al. 2008). Diese ermöglichen eine einfache Nachverfolgung der Transduktionsrate in Zielzellen mittels Durchflusszytometrie oder Luminometrie. Durch den Vergleich der Transduktionsrate unter verschiedenen Bedingungen wie der Zugabe von potenziellen Inhibitoren der HIV-1 Infektion können diese auf ihre Wirksamkeit gegen die aus HIV-1 stammenden viralen Enzyme untersucht werden.

1.3.3.1. Resistenzmutationen im HIV-1 Pseudovirusassay

Die modulare Natur lentiviraler Vektoren erlaubt über die Pseudotypisierung hinaus weitere Modifikationen, die für die virologische Forschung relevant und im Gegensatz zur Arbeit mit pathogenen Viren auch für niedrigere Sicherheitsstufen geeignet sind. Dazu gehört auch Forschung, die bei der Arbeit mit infektiösen- und replikationskompetenten Viren als "gain-of-function" Forschung erhebliche Risiken mit sich bringen würde. Besonders herausgestellt werden soll in dieser Arbeit das Einbringen von aus der klinischen Erfahrung bekannten Resistenzmutationen in der reversen Transkriptase und Integrase von HIV-1, die sich gegen übliche Klassen von antiretroviralen Therapeutika gebildet haben. Diese Mutationen stellen eine Herausforderung für die Behandlung dar, besonders wenn eine geringe Auswahl alternativer Therapeutika zur Verfügung steht. Dementsprechend sind sie auch für die Entwicklung zukünftiger Wirkstoffe relevant, da eine Ergänzung der Therapieoptionen nicht mit denselben Resistenzen unwirksam gemacht werden sollte.

Die Mutationen wurden während der in Kapitel 5.1.1. beschriebenen Vorarbeiten (Woens 2018) ausgewählt und in Vektoren eingebracht und umfassen zu diesem Zeitpunkt bekannte, klinisch hoch relevante Resistenzmutationen gegen NRTIs, NNRTIs und INSTIs (siehe Tabellen 3 und 4). Zur Auswahl wurde die Stanford HIV drug resistance Database (Rhee et al. 2003) sowie die Liste der bekannten Resistenzmutationen von HIV-1 der International Antiviral Society der USA genutzt (Wensing et al. 2016).

1.3.4. SARS-CoV-2-Pseudovirusassay

Der vorgestellte Assay wurde im nächsten Schritt entscheidend weiterentwickelt, indem der lentivirale Vektor mit dem Spike-Protein von SARS-CoV-2 pseudotypisiert wurde. Anstelle des bisherigen Fokus auf die reverse Transkriptase und Integrase des Vektors nutzt der Assay nun die Möglichkeit, lentivirale Vektoren durch Pseudotypisierung auch als Modell für andere Viren zu nutzen. Dieser mit dem Spike-Protein pseudotypisierte Vektor verhält sich beim Eintritt in Zellen mit dem ACE2-Rezeptor wie SARS-CoV-2, während die Vorteile der lentiviralen Vektoren – einfache Handhabung, Sicherheit und der zuverlässige Transfer von Markergenen – erhalten bleiben. Die so pseudotypisierten Vektoren werden im Folgenden zur besseren Lesbarkeit als SARS-CoV-2-Pseudoviren bezeichnet. Die Validität dieser Methode

hat bereits zur Anwendung bei SARS-CoV-1 geführt (Giroglou et al. 2004) und wurde auch für SARS-CoV-2 mit Lebendvirus-Assays validiert (Septisetyani et al. 2021; Cai et al. 2024).

Dank dieser Anpassung kann der Assay effektiv zur Untersuchung potenzieller Therapeutika und anderer Antagonisten der Coronavirusinfektion eingesetzt werden. Die generierten SARS-CoV-2-Pseudoviren wurden in verschiedenen Neutralisationsassays zu einer Reihe unterschiedlicher Zwecke eingesetzt. Diese Assays ermöglichten es, neutralisierende Antikörper im Serum geimpfter und genesener Menschen zu quantifizieren und die Ergebnisse mit klinisch validierten Tests zu vergleichen. Zudem wurden neu entwickelte Schwereketten-Antikörper getestet und potenzielle Therapeutika identifiziert, unter anderem im Rahmen eines Drug-Repurposing-Ansatzes. Neben der gerade für Antikörper üblichen, neutralisierenden Bindung der Spike-Epitope können in diesem Assay auch über andere Targets wirkende Inhibitoren einer Infektion identifiziert werden, wie der ACE2-Rezeptor oder die Proteasen TMPRSS2 und Cathepsin B/L. Wie bei der Anwendung auf HIV-1 wurde sich auch hier die Flexibilität des modularen Vektorsystems zunutze gemacht.

1.3.4.1. Nachweis von Antikörpern gegen SARS-CoV-2

Der Nachweis von Antikörpern gegen SARS-CoV-2 nahm im Rahmen der COVID-19 Pandemie verschiedene Rollen ein. Zunächst war er ein Mittel, um eine vergangene Infektion mit dem Virus festzustellen, was unter anderem in Analysen zur Verbreitung des Virus in der Bevölkerung, aber auch in der Abklärung einer Infektion als möglicher Ursache für verbleibende Beschwerden nützlich war. Ab der Entwicklung und im Laufe des Rollouts von Impfstoffen wurde dem Nachweis eine weitere wichtige Rolle zu eigen. Zur Überprüfung einer erfolgreichen Immunisierung wurde die Möglichkeit relevant, nicht nur das Vorliegen von Antikörpern oder deren Konzentration im Serum nachzuweisen, sondern auch deren Fähigkeit zur Neutralisation von infektiösen Viruspartikeln. Der reine Nachweis bindender Antikörper, der beispielsweise in ELISA-Verfahren geleistet werden kann, erlaubt keine zuverlässigen Aussagen über die Fähigkeit der Antikörper, das Virus zu neutralisieren. Zur Neutralisation muss ein Antikörper das virale Antigen so binden, dass die Interaktion mit dem Zellrezeptor blockiert oder für den Zelleintritt notwendige Konformationsänderungen verhindert werden. Eine Bindung an andere Epitope kann zwar nachgewiesen werden und als Hinweis auf einen zuvor erfolgten Kontakt herangezogen werden, vermittelt aber keine Immunität.

Die Fähigkeit zur Neutralisation kann zwischen verschiedenen Individuen und je nach Situation erheblich schwanken. Zum einen verändert sich die individuelle Immunität, da die Bindungsfähigkeit der Antikörper im Laufe der Zeit und mit mehreren Kontakten mit dem Spike-Protein eine Affinitätsreifung unterläuft, was die für die Neutralisation zentrale Bindungsfähigkeit steigert. Zum anderen veränderte sich das Virus selbst kontinuierlich und trat weltweit in mehreren, oft neue pandemische Wellen auslösenden Varianten auf. Diese zeigten neben einer Steigerung von Rezeptoraffinität und Replikationsgeschwindigkeit auch zunehmend Mutationen ihrer Spikeproteine, die die Affinität der gegen frühere Varianten und Impfstoffe gebildeten Antikörper verringerten und so eine Immunflucht vermittelten. Spätestens mit dem Aufkommen der Delta-Variante und besonders seit der Dominanz der Omikron-Variante trat dieser Effekt sehr stark in Erscheinung. Eine hohe Konzentration von Antikörpern nach einer Impfung oder einer Infektion mit einer frühen Variante bedeutete entsprechend nicht mehr zwingend eine hohe Neutralisationskapazität gegenüber einer späteren, immunevasiven Variante wie den verschiedenen Subvarianten von Omikron.

Hieraus ergab sich der Bedarf für eine schnelle Anpassung von Testverfahren, um zuverlässig die neutralisierende Wirkung von Antikörpern auf neu auftretende Virusvarianten nachzuweisen. Der vorgestellte Assay bietet diese Möglichkeit durch die beschriebenen Vorteile der einfachen Modifikation des Envelopes und den Nachweis der neutralisierenden Wirkung im zellbasierten Assay.

2. Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung, Etablierung und Anwendung eines Pseudovirusassays auf Basis lentiviraler Vektoren als flexible Plattform zur Untersuchung antiviraler Interventionsstrategien. Der Schwerpunkt lag auf der Frage, inwieweit ein solcher Assay geeignet ist, inhibitorische beziehungsweise neutralisierende Effekte unterschiedlicher antiviraler Ansätze zuverlässig zu erfassen. Dazu gehörten niedermolekulare Wirkstoffe, die neutralisierende Aktivität humoraler Immunantworten sowie im Mausmodell generierte Schwereketten-Antikörper.

Anhand der Modellsysteme HIV-1 und SARS-CoV-2 sollte gezeigt werden, dass sich die Plattform an unterschiedliche virale Targets und sich wandelnde infektiologische Fragestellungen anpassen lässt. Die Arbeit demonstriert, dass lentivirale Pseudovirusassays ein vielseitiges Werkzeug für die präklinische Evaluierung antiviraler und immunologischer Ansätze in der virologischen Forschung darstellen.

3. Geräte und Materialien

Alle in den beschriebenen Versuchen verwendeten Geräte und Arbeitsmaterialien sind nachfolgend aufgelistet. Die Entsorgung von Material und Reagenzien erfolgte nach den geltenden Richtlinien.

3.1. Geräte

Gerätetyp	Gerätename	Firma
Durchflusszytometer	BD FACS Canto II (Laser: 407 nM, 488 nM, 633 nM)	BD Biosciences (New Jersey, USA)
Durchflusszytometer	BD FACS Aria IIIu (Laser: 407 nM, 488 nM, 561 nM, 633 nM)	BD Biosciences
Inkubator	Heraeus Heracell 150i CO ₂	ThermoFisher Scientific (Dreieich, USA)
Inkubator	Heraeus function line	ThermoFisher Scientific
Lichtmikroskop	CKX41	Olympus Europa SE & Co. KG (Hamburg, Deutschland)
Pipettierhilfe	PIPETBOY acu 2	INTEGRA Biosciences AG (Zizers, Schweiz)
Pipettierhilfen	Eppendorf Research/Plus (0,5-1000 µL, Ein- und Mehrkanalpipetten)	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)
Plattenlesegerät	Tecan Infinite M200	Tecan Group AG (Männedorf, Schweiz)
Sicherheitswerkbank	Heraeus HERAsafe HS18/HS18.2	ThermoFisher Scientific (vormals Kendro Laboratory)
Thermomixer	Thermomixer Compact 5350	Eppendorf SE
Vortexer	VF2	IKA-Werke GmbH (Balingen-Fromme, Deutschland)
Wasserbad	PD Prüfgeräte WBT 22	PD Industriegesellschaft mbH Prüfgerätewerk Dresden (Dresden, Deutschland)
Zentrifuge	Rotanta 460 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Tuttlingen, Deutschland)
Zentrifuge	Eppendorf centrifuge 5415 C	Eppendorf SE
Zentrifuge	Sorvall RC-5C plus (Mit Rotor HB-6)	ThermoFisher Scientific

3.2. Materialien

Verbrauchsmaterialien

Name	Artikelnr.	Firma
Combitips advanced 0,5 mL	30089421	Eppendorf SE
Deckgläser 0,4 mm	0351000	Paul Marienfeld GmbH (Lauda-Königshofen, Deutschland)
Einmalspritze Discardit II 10 mL	309110	BD BioSciences
Filterspitzen Biosphere 0,1-2,5 µL	70.1130.212	SARSTEDT AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
Filterspitzen Biosphere 20 µL	70.760.213	SARSTEDT AG & Co. KG
Filterspitzen Biosphere 100 µL	70.760.212	SARSTEDT AG & Co. KG
Filterspitzen Biosphere 200 µL	70.760.211	SARSTEDT AG & Co. KG
Filterspitzen Biosphere 1000 µL	70.762.211	SARSTEDT AG & Co. KG
Kimax Glas-Zentrifugenröhrchen 30 mL	Z514888	Kimble, DWK Life Sciences (Wertheim/Main, Deutschland)
Kunststoffröhren 5 mL	55.1597	SARSTEDT AG & Co. KG
Kunststoffröhren 50 mL	62.547.254	SARSTEDT AG & Co. KG
Mehrzweckgefäße 30 mL	201170	Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster, Österreich)
Neubauer Zählkammer improved	0640010	Paul Marienfeld GmbH
Parafilm M	P7793	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Petrischalen für Zellkultur 10 cm	83.3902	SARSTEDT AG & Co. KG
Pipettenspitzen 0,1-10 µL	4840	Corning Incorporated (Corning, New York, USA)
Pipettenspitzen 200 µL	70.3030	SARSTEDT AG & Co. KG
Pipettenspitzen 1000 µL	70.3050	SARSTEDT AG & Co. KG
Reaktionsgefäße 0,2 mL	72.737.002	SARSTEDT AG & Co. KG
Reaktionsgefäße 0,5 mL	72.699	SARSTEDT AG & Co. KG
Reaktionsgefäße 1,5 mL	72.690.001	SARSTEDT AG & Co. KG
Reaktionsgefäße 2 mL	0030120.094	Eppendorf SE
Reaktionsgefäße 15 mL	188271	Greiner Bio-One International GmbH
Serologische Pipetten 2 mL	86.1252.001	SARSTEDT AG & Co. KG
Serologische Pipetten 5 mL	86.1253.001	SARSTEDT AG & Co. KG
Serologische Pipetten 10 mL	86.1254.001	SARSTEDT AG & Co. KG
Serologische Pipetten 25 mL	86.1685.001	SARSTEDT AG & Co. KG
Spritzenvorsatzfilter CA (0,45 µm)	7699833	Th. Geyer GmbH & Co KG (Renningen, Deutschland)
Zellkulturflasche T25 (50 mL weißer Filterschraubdeckel (Suspensionszellen)	690195	Greiner Bio-One International GmbH

Zellkulturflasche T75 (250 mL weißer Filterschraubdeckel (Suspensionszellen))	658195	Greiner Bio-One International GmbH
Zellkulturplatten, 6-Well, für adhärenzte Zellen	657160	Greiner Bio-One International GmbH
Zellkulturplatten, 6-Well, für Suspensionszellen	657185	Greiner Bio-One International GmbH
Zellkulturplatten, 24-Well, für adhärenzte Zellen	622160	Greiner Bio-One International GmbH
Zellkulturplatten, 24-Well, für Suspensionszellen	622102	Greiner Bio-One International GmbH
Zellkulturplatten, 96-Well, weiß, für adhärenzte Zellen	655083	Greiner Bio-One International GmbH

Kommerzielle Kits

Bezeichnung	Artikelnr.	Firma
QIAquick Spin Miniprep Kit	27104	QIAGEN (Hilden, Deutschland)
QIAGEN Plasmid Plus Maxi Kit	12963	QIAGEN

Chemikalien, Puffer und Reagenzien

Bezeichnung	Artikelnr.	Firma
0,05% Trypsin-EDTA (1X)	25360-054	Gibco, Fisher Scientific
Ambion Nukleasefreies Wasser	AM9937	Invitrogen, Fisher Scientific (siehe ThermoFisher Scientific)
Antifect N liquid	113940	Schülke & Mayr (Norderstedt, Deutschland)
CaCl ₂ (getrocknet)	K90676320	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
CellTiter-Glo	G8461	Promega GmbH (Walldorf, Deutschland)
Chloroquin-diphosphat (Salz)	C6628-25G	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	D4540	Sigma-Aldrich
D-(+)-Glucose	G5400-1KG	Sigma-Aldrich
D-Luciferin	L2916	Invitrogen, Fisher Scientific
Fetales Rinderserum (FBS)	F7524	Sigma-Aldrich
HEPES (freie Säure)	101926	ICN Biomedicals GmbH (Eschborn, Deutschland)
Hexadimethrin-bromid (Polybren)	H9268-10G	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid (KCl)	6781.3	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
L-Glutamine [200mM]	25030-24	Gibco, Fisher Scientific (siehe ThermoFisher Scientific)

di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	4984.1	Carl Roth GmbH + Co. KG
Natriumchlorid (NaCl)	7647-14-5	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
Natriumhydroxid (NaOH)	1.06495.0250	Merck KGaA
PBS (1X) ohne CaCl ₂ , ohne MgCl ₂	14190-94	Gibco, Fisher Scientific
Penicillin (10.000 U/mL) + Streptomycin (10.000 µg/mL)	15140-122	Gibco, Fisher Scientific
HBS (2X) im Labor hergestellt aus: 8.0 g NaCl 0.38 g KCl 0.10 g Na ₂ HPO ₄ 5.0 g HEPES 1.0 g D-Glucose auf pH 7.05 eingestellt mit NaOH in 500 mL H ₂ O	-	-

Vektoren / Plasmide

Name	Eigenschaft	Referenz
HIV-1 Plasmide		
pMDLg/pRRE	HIV-1 gag/pol- Expressionsplasmid für lentivirale Vektoren	(Dull et al. 1998)
pRSV-Rev	HIV-1 rev- Expressionsplasmid für lentivirale Vektoren	(Dull et al. 1998)
pMDLg/pRRE-intD64V	HIV-1 gag/pol- Expressionsplasmid mit defekter Integrase, Mutation D64V	(Yáñez-Muñoz et al. 2006)
dRT-pMDLg/pRRE	HIV-1 gag/pol- Expressionsplasmid mit defekter reversen Transkriptase, Mutationen V249D/V259D	(Mock et al. 2014)
pMDLg/pRRE-resINSTI	HIV-1 gag/pol- Expressionsplasmid mit INSTI-resistenter Integrase, Mutationen: T97A, E138K, S147G, N155H	Siehe Methoden
pMDLg/pRRE-resNNRTI	HIV-1 gag/pol- Expressionsplasmid mit NNRTI-resistenter reverser Transkriptase, Mutationen: L100I, K103N, Y181C	Siehe Methoden

pMDLg/pRRE-resNRTI	HIV-1 gag/pol-Expressionsplasmid mit NRTI-resistenter reverser Transkriptase, Mutationen: M41L, A62V, 69 INS, L74V, M184V, L210W, T215Y	Siehe Methoden
LeGO-Vektoren		
LeGO-G2	eGFP-exprimierender „Lentiviral Gene Ontology Vektor“ (LeGO-Vektor)	(Weber et al. 2008; Weber et al. 2010)
LeGO-iG2-wPRE-pA	eGFP exprimierender LeGO-Vektor mit poly-A Signal (erhöht Titer von NRTLTV)	(Mock et al. 2014)
LeGO-iG2-Puro+-Luc2	eGFP, Puromycinresistenz und Firefly-Luciferase exprimierender LeGO-Vektor	(Weber et al. 2008; Weber et al. 2010)
LeGO-iG2-Luc2	eGFP und Firefly-Luciferase exprimierender LeGO-Vektor	(Weber et al. 2008; Weber et al. 2010)
LeGO-Luc2	Firefly-Luciferase exprimierender LeGO-Vektor	(Weber et al. 2008; Weber et al. 2010)
VSV-G-Env	Vesicular Stomatitis Virus Glykoprotein (Hüllprotein)	(Beyer et al. 2002)
SARS-CoV-2-Spike-Protein verschiedener Varianten (Herstellung siehe Methoden)		
pEF1a-Puro	Backbone für SARS-CoV-2-Spike-WT und D614G: <i>human elongation factor 1a</i> Promotor und Puromycinresistenz	(Morita et al. 2000)
pEF1a-Puro-SARS-CoV-2-Spike-wt	SARS-CoV-2-Spike-WT	Kristoffer Riecken, AddGene #183413
pEF1a-Puro-SARS-CoV-2-Spike-D614G	SARS-CoV-2-Spike-D614G	Kristoffer Riecken, AddGene #183415
pEF1a-Puro-SARS-CoV-2-Spike-wt-d19	SARS-CoV-2-Spike-WT mit Deletion von 19 C-term. Aminosäuren	Kristoffer Riecken, AddGene #183414
pEF1a-Puro-SARS-CoV-2-Spike-D614G-d19	SARS-CoV-2-Spike-D614G mit Deletion von 19 C-term. Aminosäuren	Kristoffer Riecken, AddGene #183416

pcDNA3.3-SARS-CoV-2-Spike-Delta-d18	SARS-CoV-2-Spike-Delta mit Deletion von 18 C-term. Aminosäuren	David Nemazee, AddGene #170449
pcDNA3.3-SARS-CoV-2-Spike-Omicron-BA.1-d18	SARS-CoV-2-Spike-Omikron/BA.1 mit Deletion von 18 C-term. Aminosäuren	David Nemazee, AddGene #180843
pcDNA3.3_SARS2_Omicron_BA.2	SARS-CoV-2-Spike-Omikron/BA.2 mit Deletion von 18 C-term. Aminosäuren	David Nemazee, AddGene #183700
pCAGGS SARS-CoV-2 BA.4/5 Spike	SARS-CoV-2-Spike-Omikron/BA.4/5	Marceline Côté, AddGene #186031
pCAGGS-SARS-CoV-2-Spike-BA.4/5-d18	SARS-CoV-2-Spike-Omikron/BA.4/5 mit Deletion von 18 C-term. Aminosäuren	Kristoffer Riecken (AddGene # ausstehend)
Andere		
pRRL.sin.ppt.SFFV.Ace2.IRES.Puro.wPRE	Lentiviraler Vektor zur Expression des humanen ACE2 Rezeptors	(Rebendenne et al. 2021) AddGene #145839

Schwereketten-Antikörper und Nanobodies

Klon/Bezeichnung	Beschreibung	Bezogen von/Referenz
VHH-72	Anti-SARS-CoV-1-RBD Nanobody mit hoher SARS-CoV-2-RBD Affinität	AG Koch-Nolte, UKE, (Wrapp et al. 2020)
Nb12, Nb30	Anti-SARS-CoV-2-RBD Nanobodies	AG Koch-Nolte, UKE, (Xu et al. 2021)
Loew SB23	Anti-SARS-CoV-2-RBD Nanobody aus synthetischer Bibliothek (Sybody)	AG Koch-Nolte, UKE, (Custódio et al. 2020)
L10-E	Nicht bindender Nanobody (Negativkontrolle)	AG Koch-Nolte, UKE, (Witt et al. 2024)
6SG-F2_rbFc, 6SG-F5_rbFc, 6SG-F11_rbFc, 6SG-G8_rbFc, 6SG-G12_rbFc, 6SG-H9_rbFc, 6SG-H10_rbFc, 7SG-G9_rbFc, 8SG-G1_rbFc, 8SG-H9_rbFc	Schwereketten-Antikörper auf Basis von in „LamaMice“ generierten anti-SARS-CoV-2-RBD-Nanobodies	AG Koch-Nolte, UKE, (Eden et al. 2024)

Niedermolekulare Substanzen

Substanz	Indikation/Beschreibung	Referenz/Hersteller
HIV-1 Therapeutika (nicht Reinstoff, durch Extraktion aus Tablettenpräparaten gewonnen)		
Dolutegravir	HIV-1 (INSTI)	ViiV Healthcare (München, DE)
Raltegravir	HIV-1 (INSTI)	Merck Sharp & Dohme B.V. (München, DE)
Nevirapin	HIV-1 (NNRTI)	Boehringer Ingelheim (Ingelheim, DE)
Rilpivirin	HIV-1 (NNRTI)	Janssen-Cilag International N.V. (Neuss, DE)
Efavirenz	HIV-1 (NNRTI)	Bristol-Myers Squibb (New York, USA)
Azidothymidin	HIV-1 (NRTI)	GlaxoSmithKline (London, UK)
Tenofovir diproxyl fumarat	HIV-1 (NRTI)	Gilead Sciences (Martinsried, DE)
Lamivudin	HIV-1 (NRTI)	ViiV Healthcare
Antibiotika		
Zeocin	Glykopeptid-Antibiotikum, #ant-zn-1	InvivoGen (Toulouse, Frankreich)
Blasticidin	Nukleosid-Antibiotikum, #ant-bl-1	InvivoGen
Puromycin	Aminonukleosid-Antibiotikum, P7255	Sigma-Aldrich
Drug-Repurposing Kandidaten		
Clomifenzitrat	Antiöstrogen	Extern bereitgestellt von Bernhard Ellinger, Fraunhofer IME, (Ellinger et al. 2021)
Ketoconazol	Antiandrogen, Antimykotikum	
Papaverin	Spasmolytikum	
Methotrexat	Zytostatikum, Immunsuppressivum	
Chlormidazol	Spasmolytikum, Antimykotikum	
8-Azaguanin	Akute Leukämie, Antineoplastikum	
Raloxifen	Selektiver Östrogenrezeptormodulator	
Y-134	Raloxifen-derivat (SERM)	
Drotaverin	Spasmolytikum	
Posaconazol	Antimykotikum	
Thioguanosin	Leukämie Guanin-Analog)	
MG-132	Proteasominhibitor	
Cetylpyridiniumchlorid	Mundraumentzündungen, Antiseptikum	
Tanaproget	Nichtsteroidales Progestin	
Homoharringtonin	Proteinsyntheseinhibitor	
Luminespib	Versch. Tumore, Hsp90-inhibitor	
Nelfinavir	HIV-1/AIDS, Proteaseinhibitor	
Harringtonin	Proteinsyntheseinhibitor	
Ravuconazol	Antimykotikum	
AC1NDSS5	Sulfoniumsalz	

Andere		
MDL2, SDM17, SDM17E, MT1, LM8	Peptide mit inhibitorischem Potenzial gegen SARS-CoV-2	Prof. Vincenzo Summa, Universität Neapel Federico II
Substanzen 1-31	Niedermolekulare Substanzen aus anti-HIV-1 Hochdurchsatz-screening	Bezogen von Enamine, (Ellinger et al. 2020)
RBD-PE	An die Rezeptorbindungsdomäne des SARS-CoV-2-Spikeproteins gebundenes Phycoerythrin (Fluoreszenzfarbstoff)	AG Koch-Nolte, UKE

Bakterien

Bezeichnung	Artikelnr.	Firma
<i>E. coli</i> Top10 F'	10113902	Invitrogen, Fisher Scientific

Zelllinien

Name	Eigenschaft	ATTC/Referenz
HEK-293T	Humane embryonale Nierenzelllinie	CRL-11268
HEK293T-ACE2	ACE2-exprimierende HEK293T-Linie	selbst etabliert
PM1	Humane CD4+ T-Zelllinie	31973
CaCo2	Humane kolorektale Adenokarzinom-Zelllinie	HTB-37
Calu3	Humane lungenepitheliale Adenokarzinom-Zelllinie	HTB-55
VeroE6	Nierenzelllinie aus Afrikanischen Grünen Affen	CRL-1586

Zellkulturmedien

Zelllinie	Medium	Hersteller	Artikelnummer
HEK-293T	DMEM (1X) + GlutaMAX –I Medium mit 4,5 g/l D-Glucose + Pyruvat + 10% FCS + 100 U/mL Penicillin + 100 µg/mL Streptomycin + 25 mM HEPES	Gibco	31966-021
HEK293T-ACE2		Sigma	F7524
CaCo2		Gibco	15140-122
Calu3		Gibco	15140-122
VeroE6		Gibco	15630-056
PM1	RPMI-1640 (inkl. Glutamin) + 15% FCS + 100 U/mL Penicillin + 100 µg/mL Streptomycin + 25 mM HEPES	Gibco	61870044
		Sigma	F7524
		Gibco	15140-122
		Gibco	15140-122
		Gibco	15630-056

Software

Programm	Firma
GraphPad PRISM, Version 8	GraphPad Software Inc. Boston, MA, USA
FACSDiva, Version 9.0	BD BioSciences
NanoDrop ND-1000, Version 3.8	Gibco, Fisher Scientific

4. Methoden

4.1. Versuchsübergreifende Methoden

4.1.1. Kultivierung von humanen Zellen

Alle in den beschriebenen Versuchen verwendeten Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von etwa 90% kultiviert. Zellen, die in Versuchen mit nicht-revers-transkribierenden lentiviralen Vektoren (NRTLVs) verwendet wurden, wurden während des Versuches ab der Transduktion bei 32°C kultiviert. Die Zelllinien wurden jeweils in dem im Abschnitt Material (Kapitel 3.2.) beschriebenen Medium gehalten. Zur Verwendung in Versuchen wurden die adhärenenten Zellen nach Erreichen von etwa 80% Konfluenz in 10 cm Petrischalen mit PBS gewaschen, trypsinisiert und in Medium resuspendiert, bevor sie in den entsprechenden Zellkulturplatten in der jeweils gewünschten Anzahl vorgelegt wurden. PM1 wurde als Suspensionszelllinie zur Verwendung in Versuchen direkt in RPMI aufgenommen.

4.1.2. Herstellung von HEK293T-ACE2-Zellen

50.000 HEK293T-Zellen wurden in einer 24-Well Zellkulturschale mit 100 µL des Vektors pRRL.sin.ppt.SFFV.Ace2.IRES.Puro.wPRE (AddGene 145839) transduziert. Die Zellen wurden zur Selektion über 21 Tage mit 1 µg/mL Puromycin behandelt. Anschließend wurden sie mit einer an PE gekoppelten SARS-CoV-2 Spike-Rezeptorbindungsdomäne (Spike-RBD, AG Nolte, UKE) angefärbt und im FACS Aria IIIu Durchflusszytometer auf hohe ACE2-Expression sortiert. Die Zellen wurden dabei einzeln in eine 96-Well Platte abgelegt, um von Einzelzellen stabile Klone auswachsen zu lassen. Der Klon mit dem stärksten Signal nach Transduktion mit einem SARS-CoV-2-Pseudovirus (Klon 2G7, siehe Kapitel 5.2.2., Abbildung 21) wurde ausgewählt und kultiviert. Diese Zellen werden im weiteren als HEK293T-ACE2 bezeichnet.

4.1.3. Herstellung lentiviraler Vektoren in HEK293T-Zellen

Die Produktion lentiviraler Partikel erfolgte in HEK293T-Zellen, die mittels der Calciumphosphat-Methode mit den unter Material aufgelisteten Plasmiden (siehe Kapitel 3.2.) gemäß des in Tabelle 2 aufgeführten Schemas transfiziert wurden.

Tabelle 2: Plasmide und Mengenangaben für die Herstellung von lentiviralen Vektoren in HEK293T-Zellen.

Vektor-Plasmid:	10-20 µg / 10 cm Schale
Gag/Pol-Plasmid:	10 µg / 10 cm Schale
Rev-Plasmid:	5 µg / 10 cm Schale
Envelope-Plasmid:	2 µg / 10 cm Schale (VSV-G) oder 4 µg / 10 cm Schale (SARS-CoV-2-Spike)

Je 5×10^6 HEK-293T-Zellen wurden am Nachmittag in 10-cm-Petrischalen in 10 mL DMEM ausgesät. Die Reagenzien und Plasmide wurden am folgenden Morgen aufgetaut und gemeinsam mit dem Medium auf Raumtemperatur gebracht. Die Plasmide wurden in 450 µL sterilem H₂O verdünnt und mit 50 µL 2,5 M CaCl₂ Lösung aufgefüllt. 500 µL 2X HBS wurden in 15 mL spitz zulaufende Falcon Reaktionsgefäße gefüllt. Die DNA/CaCl₂ Mixtur wurde tröpfelnd zum HBS hinzugefügt, während konstant mittels einer Pasteurpipette Luft durch das HBS gepustet wurde. Die Mischung wurde zur Bildung des DNA-Präzipitats bei Raumtemperatur 10 Minuten inkubiert. Das alte Medium wurde von den Zellen entfernt und 10 mL frisches Medium mit 25 µM Chloroquin wurde hinzugefügt. Die DNA-Mixtur wurde unter konstanter Durchmischung des Mediums mittels Schwenken der 10-cm-Petrischale tröpfchenweise hinzugefügt. Die Zellen wurden für 6-12 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ und ca. 90% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach der Inkubationsphase wurde das Medium gewechselt und durch 8 mL DMEM (ohne Chloroquin) ersetzt. Der Überstand wurde alle 8-16 Stunden mittels einer Spritze geerntet, durch einen 0,45-µm Filter in 2 mL Reaktionsgefäße transferiert und bei –80 °C eingefroren (Weber, 2008). Dieses Protokoll und weitere Informationen zum Vektor sind unter www.LentiGO-Vectors.de (letzter Zugriff: 17.06.2026) einsehbar.

4.1.3.1. Generation modifizierter lentiviraler Vektoren im HIV-1-Assay

Nicht-integrierende lentivirale Vektoren (NILV) wurden mit einer defekten, mutierten Integrase im Gag-Pol Plasmid (pMDLg/pRRE-intD64V; Mutation D64V; (Yáñez-Muñoz et al. 2006)) generiert. Das oben beschriebene Protokoll wurde befolgt, wobei der geerntete Überstand zum Aufkonzentrieren in 30-mL Glasröhrchen bei 7000 xg und 4°C über Nacht zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde sodann aspiriert bis nur noch 300 µL in den Glasröhrchen übrig waren (100-fache Volumenreduktion). Das fast unsichtbare Viruspellet wurde darin resuspendiert und die konzentrierten Überstände wurden bei –80°C in 2-mL Reaktionsgefäßen eingefroren.

Nicht revers-transkribierende lentivirale Vektoren (NRTLVs) wurden mit einer defekten, mutierten reversen Transkriptase im Gag-Pol Plasmid (dRT-pMDLg/pRRE; Mutationen V249D, V250D; (Mock et al. 2014)) und dem LeGO-iG2-wPRE-pA Vektor generiert. Davon abgesehen wurde das Standardprotokoll befolgt.

Multiresistente lentivirale Vektoren wurden wie folgt generiert: De novo synthetisierte Fragmente des Gag-Pol Gens mit den ausgewählten Mutationen wurden bestellt (GeneArt, ThermoFisher). Das jeweilige Wildtyp-Fragment wurde mit Restriktionsenzymen aus dem Plasmid mit dem Gag-Pol Gen ausgeschnitten und das mutierte Fragment mittels DNA-Ligation eingefügt. Die spezifischen Mutationen und Enzyme sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Multiresistente lentivirale Vektoren mit eingefügten Mutationen.

Vektor	Eingefügte Mutationen
resINSTI	T97A, E138K, S147G, N155H
resNRTI	M41L, A62V, 69 INS, L74V, M184V, L210W, T215Y
resNNRTI	L100I, K103N, Y181C

Kompetente *E. coli* Top10F' Bakterien wurden transformiert, Kolonien wurden am nächsten Tag für Übernachtskulturen gepickt und die modifizierten Plasmide wurden via Plasmid-Miniprep extrahiert (QIAquick Spin Miniprep Kit, Qiagen). Diese Klonierungen hatte ich im Rahmen meiner Masterarbeit durchgeführt (Woens 2018). Alle Sequenzen können auf Nachfrage bereitgestellt werden.

4.1.3.2. Generation von SARS-CoV-2-Pseudoviren

Für die Analyse der Inhibition wurden lentivirale Vektoren mit den Oberflächenproteinen verschiedener Virusvarianten pseudotypisiert (Wildtyp Wuhan-1, die Variante D614G, Delta, Omikron BA.1, BA.2 und BA.5). Diese Schritte wurden nicht von mir selbst durchgeführt, sind hier aber zur Nachvollziehbarkeit kurz beschrieben. Ebenfalls Erwähnung finden sie in (Kuzikov et al. 2022; Bojkova et al. 2026; Eden et al. 2024).

Die Expressionsplasmide für die jeweiligen Spikeproteinvarianten wurden mittels klassischer Klonierungstechniken hergestellt. Als Backbone für die Herstellung der Expressionsplasmide für Spike-Proteine des Wildtyp-Virus und der Variante D614G wurde das Plasmid pEF1a-Puro verwendet. In dieses wurde die cDNA des SARS-CoV-2 Spike-Proteins (de-novo synthetisiert und für humane Zellen Codon-optimiert) kloniert. Die Mutation D614G wurde mittels PCR

eingefügt. Im weiteren Schritt wurden mittels PCR in beiden cDNAs die Codons für die 19 C-terminalen Aminosäuren entfernt, da in der Literatur beschrieben wird, dass sich hierdurch der Pseudovirustiters erhöhen lässt.

Als Expressionsplasmide für die Spike-Proteine der Virusvarianten Delta, Omikron/BA.1 und Omikron/BA.2 wurden direkt über Addgene verfügbare Plasmide von David Nemazee verwendet (siehe Kapitel 3.2.), die das Plasmid pcDNA3.3 als Backbone nutzten und das Spikeprotein der jeweiligen Variante mit bereits durchgeführter Deletion der 18 C-terminalen Aminosäuren enthielten. Für das Spikeprotein von Omikron/BA.5 wurde über Addgene ein Plasmid von Marceline Côté bestellt, in dem sodann die d18-Modifikation eingefügt wurde.

4.1.4. eGFP-basierter Inhibitionsassay mittels Durchflusszytometrie

Zur Analyse der Expression von eGFP durch die Pseudoviren und deren Inhibition durch Testsubstanzen mittels Durchflusszytometrie wurden 50.000 Zellen in einer 24-Well Zellkulturplatte in je 500 µL DMEM ausplattiert. Zu analysierende Substanzen mit unbekanntem Wirkmechanismus wurden in Verdünnungsreihen direkt zu den Zellen gegeben. Serum und Schwereketten-Antikörper, deren Wirkung über die Bindung an Viruspartikel vermittelt ist, wurden hingegen im Pseudovirusvolumen verdünnt. Zellen und Substanzen wurden 60 min, Vektorüberstand und Substanzen 30 min bei 37°C und 5% CO₂ sowie etwa 90% Luftfeuchtigkeit ko-inkubiert, um eine mögliche Zellaufnahme und den Ablauf inhibitorischer Prozesse beziehungsweise die neutralisierende Bindung zu ermöglichen. Nach der Inkubation wurden 50 µL der Pseudoviren zu jedem Well hinzugegeben. Als Kontrollen wurden vollständig unbehandelte Wells sowie Wells mit Pseudovirus aber ohne Substanzen verwendet. Alle Proben wurden in jeweils drei Replikaten pipettiert. Die Analyse der Transduktion wurde 3 Tage später mittels der durchflusszytometrischen Messung des Anteils eGFP-positiver Zellen durchgeführt. Die Inhibition wurde als Dosis-Wirkungs-Kurve geplottet und die IC₅₀- bzw. NT₅₀-Werte in PRISM8 (GraphPad) berechnet.

4.1.5. Luciferase-basierter Inhibitionsassay mittels Luminometrie

Zur Analyse von Pseudovirus-inhibierenden Substanzen und -neutralisierenden Antikörpern mittels Luciferase-Assay wurden 20.000 Zellen in einer 96-Well Zellkulturplatte in je 50 µL DMEM ausgesät. Zu analysierende Substanzen mit unbekanntem Wirkmechanismus wurden

in Verdünnungsreihen direkt zu den Zellen gegeben, Angaben zur Konzentration sind hier auf das finale Volumen im Well bezogen. Serum und Schwereketten-Antikörper, deren Wirkung über die Bindung an Viruspartikel vermittelt wird, wurden im Vektorüberstand verdünnt, Angaben zu Konzentrationen sind hier auf das Volumen des Vektorüberstandes bezogen. Zellen und Substanzen wurden 60 min, Vektorüberstand und Substanzen 30 min bei 37°C und 5% CO₂ sowie etwa 90% Luftfeuchtigkeit ko-inkubiert, um eine mögliche Zellaufnahme und den Ablauf inhibitorischer Prozesse beziehungsweise die neutralisierende Bindung zu ermöglichen. Nach der Inkubation wurden 20 µL des Vektorüberstandes zu jedem Well hinzugegeben. Als Kontrollen wurden vollständig unbehandelte Wells sowie Wells mit Pseudovirus aber ohne Substanzen verwendet. Alle Proben wurden in jeweils drei Replikaten pipettiert. Nach 2 Tagen Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit wurden 50 µL Luciferin (500 µM in PBS) zu jedem Well hinzugegeben. Die Analyse der Luciferase-Aktivität als Marker der Transduktionsrate wurde im Tecan Infinite M200 Plattenlesegerät durchgeführt. Die Inhibition wurde als Dosis-Wirkungs-Kurve geplottet und die IC₅₀- bzw. NT₅₀-Werte wurden in PRISM8 berechnet.

4.2. HIV-1 Inhibitionsassay

Der HIV-1 Inhibitionsassay wurde sowohl in den in Kapitel 5.1.1. gezeigten Vorarbeiten (Woens 2018) als auch in den darauf aufbauenden, in Kapitel 5.1.2. – 5.1.4. nachfolgenden Versuchen verwendet. Die in 4.2.1. und 4.2.2. beschriebenen Methoden wurden nur in den Vorarbeiten verwendet.

4.2.1. Quantifizierung der Inhibition von integrierenden Vektoren.

Der Assay wurde mittels eGFP/Durchflusszytometrie auf PM1-Zellen durchgeführt. Die Substanzen wurden in Konzentrationen von 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 µM, 3 µM und 10 µM in 2,5 µL DMSO verdünnt und in Triplikaten zu den Zellen gegeben (finale DMSO-Konzentration 0,5%). Die Negativkontrollen wurden mit 2,5 µL DMSO in drei Replikaten behandelt, um eine konstante Konzentration von 0,5% DMSO in allen Proben einzustellen. Drei Wells wurden als Positivkontrolle mit 300 nM Raltegravir (ebenfalls in 2,5 µL DMSO) behandelt. Nach der Inkubation wurden die Pseudoviren in 25 µL PBS pro Well verdünnt, mit einer angestrebten Transduktionsrate von etwa 30% (in den Negativkontrollen mit DMSO).

4.2.2. Analyse der Inhibition von nicht integrierenden Vektoren

Der Assay wurde auf HEK293T-Zellen durchgeführt. Die Substanzen wurden in einer Konzentration von einem sechsfachen der berechneten IC₅₀ aus dem ersten Aktivitätsassay dosiert, um starke und eindeutige Ergebnisse zu erhalten, und in Triplikaten direkt zu den Zellen gegeben. Die Negativkontrollen wurden mit 2,5 µL DMSO in zwei Replikaten behandelt. 300 nM Raltegravir und 5 µM Azidothymidin wurden als Positivkontrollen verwendet. Nach der Inkubation wurde Vektor (NILV oder NRTLTV) in 25 µL PBS pro Well verdünnt und hinzugefügt, wobei eine Transduktionsrate von 60% in den DMSO-behandelten Negativkontrollen angestrebt wurde. Die Analyse der Transduktion mittels Durchflusszytometrie erfolgte nach 3 Tagen Inkubation bei 37°C für NILVs und nach 2 Tagen bei 32°C für NRTLTVs.

4.2.3. Analyse der Inhibition von resistenten Vektoren

Um den Einfluss der Resistenzmutationen auf die Wirkung im Assay zu bestätigen, wurden alle Vektoren mit den folgenden Medikamenten behandelt: Azidothymidin (AZT, ein NRTI, auch bekannt als Zidovudin), Lamivudin (3TC, ein NRTI), Tenofovir diproxyl fumarat (TDF, ein NRTI), Dolutegravir (DTG, ein INSTI), Raltegravir (RAL, ein INSTI), Efavirenz (EFV, ein NNRTI) und Nevirapine (NVP, ein NNRTI). Diese Medikamente sind Teil der "WHO List of Essential Medicines" und werden als Therapieoptionen für HIV-1 Patienten empfohlen. Zu Vergleichszwecken wurden zusätzlich im weiteren Verlauf der Experimente mit resistenten Vektoren die Substanzen Etravirin (ETV, ein NNRTI) und Rilpivirin (RPV, ein NNRTI) verwendet.

Dieser Assay wurde nach demselben Protokoll wie der Assay zur Untersuchung der Wirkung der experimentellen Substanzen auf integrierenden Vektoren durchgeführt (siehe Kapitel 4.2.1). Die Medikamente wurden in denselben Konzentrationen angesetzt und pipettiert, wie zuvor die untersuchten Substanzen. Die sich ergebenden IC₅₀-Werte der Medikamente auf den resistenten Pseudovirus wurden mit ihren IC₅₀-Werten auf dem Wildtyp-Pseudovirus verglichen und ein Resistenzfaktor wurde kalkuliert.

Alle aktiven Substanzen wurden daraufhin auf ihre Inhibitionspotenz bei diesen modifizierten Resistenzvektoren getestet. Hierfür wurden HEK293T-Zellen im eGFP-Assay verwendet. Die Substanzen wurden in der Konzentration entsprechend ihrer zuvor kalkulierten IC₅₀ dosiert.

4.2.4. Toxizitätsassay für Substanzen und HIV-1-Medikamente

Zur Herstellung einer stabil Luciferase-exprimierenden Zelllinie (HEK293T-Luc) wurden 200.000 HEK293T-Zellen in einer 6-Well Zellkulturplatte in 1 mL DMEM ausgesät und die Wells mit 8 µl, 16 µl, 32 µl oder 64 µl des Luciferase, eGFP und Puromycinresistenz exprimierenden Vektors LeGO-Luc2-iG2-Puro⁺ transduziert. Die Zellen wurden nach 3 Tagen durchflusszytometrisch anhand der eGFP-Expression auf ihre Transduktionsrate untersucht. Aus dem mit 32 µl Vektor transduzierten Well, das eine Transduktionsrate von 55,2% erreicht hatte, wurden die Zellen zur Selektion in eine 10-cm Petrischale mit 10 mL DMEM überführt und 3 Tage mit 1 µg/mL Puromycin zur Selektion behandelt. Nach dieser Selektion ergab die durchflusszytometrische Untersuchung eine Rate von >90% eGFP positiven Zellen. Im weiteren Verlauf der Versuche wurden die Zellen weiter mit 1 µg/mL Puromycin behandelt.

Je 200 dieser HEK293T-Luc-Zellen wurden in einer 96-Well Zellkulturplatte in 50 µL DMEM ausgesät. Die geringe Zellzahl stellte sicher, dass die Zellen über 6 Tage ohne Auftreten von Kontaktinhibition wachsen konnten. Die Substanzen (Substanz 1, Substanz 3, Substanz 23, Substanz 28, Substanz 31, Efavirenz, Raltegravir, Nevirapin, Dolutegravir) wurden in den Konzentrationen 100 nM, 300 nM, 1 µM, 3 µM, 10 µM und 30 µM in Triplikaten hinzugefügt. Als Positivkontrollen wurden die Antibiotika Zeocin und Blasticidin in den Konzentrationen 5 µg/mL, 15 µg/mL, 50 µg/mL, 150 µg/mL und 500 µg/mL bzw. in den Konzentrationen 1 µg/mL, 3 µg/mL, 10 µg/mL, 30 µg/mL und 100 µg/mL eingesetzt. 3 Wells ohne Substanzen wurden als Negativkontrolle verwendet. Nach 3 und 6 Tagen Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit wurden 50 µL bzw. 100 µL Luciferin (500 µM in PBS) jedem Well hinzugegeben.

4.3. SARS-CoV-2 Inhibitionsassay

4.3.1. Analyse der Antikörperaktivität in Serumproben

Inaktivierte humane Serumproben wurden im Luciferase-Assay (siehe 3.1.4.) analysiert. Die Proben wurden in den Verdünnungsstufen 1:10, 1:30, 1:100, 1:300, 1:1000 und 1:3000 im Vektorüberstand verdünnt und in Triplikaten zu HEK293T-ACE2-Zellen gegeben.

4.3.2. Analyse der Inhibition durch Peptide

Potenziell inhibitorische Peptide gegen SARS-CoV-2 (MDL2, SDM17, SDM17E, MT1, LM8) wurden durch Prof. Vincenzo Summa (Universität Neapel Federico II) und Dr. Bernhard Ellinger (Fraunhofer IME) bereitgestellt. Die Analyse erfolgte im Luciferase-Assay. Die Aliquots wurden in 12 seriellen 1:3-Verdünnungen angesetzt. Für MDL2 von 211 μM bis 3,6 nM, für SDM17 von 336 μM bis 5,7 nM, für SDM17E von 328 μM bis 5,5 nM, für MT1 von 339 μM bis 5,7 nM und für LM8 von 194 μM bis 3,3 nM. Die Konzentrationen wurden jeweils in Triplikaten pipettiert. Als Zellen wurden sowohl CaCo2 als auch HEK293T-ACE2 genutzt.

4.3.3. Analyse der Inhibition durch niedermolekulare Substanzen

Beginnend mit 20 Substanzen aus einem Hochdurchsatzscreening für potenzielle niedermolekulare Inhibitoren von SARS-CoV-2 (Ellinger et al. 2021) wurde eine Reihe von Versuchen durchgeführt, in deren Verlauf die Anzahl der getesteten Substanzen verringert und der Detailgrad der Messung erhöht wurde.

Im ersten Versuch wurden die 20 Substanzen (in DMSO gelöst) in einer finalen Konzentration von 10 μM in Triplikaten pipettiert und im Luciferase-Assay auf CaCo2-Zellen gemessen. Zusätzlich zum oben beschriebenen Protokoll wurden Wells ohne Vektor pipettiert und vor der Messung mit CellTiter-Glo versetzt, um das Zellüberleben luminometrisch zu erfassen.

Die aus dem vorherigen Assay ausgewählten 8 Substanzen wurden im nächsten Versuch sowohl auf ihre dosisabhängige Wirkung untersucht als auch auf ihre Inhibition von VSV-Pseudoviren und ihren Einfluss auf das Zellüberleben (mittels CellTiter-Glo). Die Messung wurde im Luciferase-Assay durchgeführt. Es wurden Verdünnungsreihen von 12 Schritten mit 1:2-Verdünnungen, zwischen 10 mM und 4,88 μM , in DMSO verwendet und in Triplikaten pipettiert. Es wurden 4.000 CaCo2-Zellen je Well in 384-Well Platten ausgesät.

Raloxifen wurde erneut sowohl im eGFP- als auch im Luciferase-basierten Assay getestet, um eine Interaktion mit dem Luciferase-Assay selbst auszuschließen. Der Konzentrationsbereich umfasste 10.000 nM – 30 nM im eGFP-Assay und 30.000 nM – 100 nM im Luciferase-Assay. Als Zellen wurden HEK293T-ACE2 verwendet. Zur Untersuchung, ob die Wirkung von Raloxifen SARS-CoV-2-spezifisch ist, wurde erneut der Luciferase-basierte Assay verwendet. Hierzu wurden sowohl SARS-CoV-2-D614G-Pseudoviren als auch VSV-Pseudoviren mit einer

Einzeldosis von 5 μM Raloxifen behandelt. Als Kontrolle wurde der Nanobody VHH72 verwendet. Als Zellen wurden HEK293T-ACE2 verwendet. Zum Vergleich der Wirkung in Abhängigkeit von Zelltypen und Pseudovirusvariante wurde Raloxifen im eGFP-Assay in allen 9 Kombinationen von HEK293T-ACE2-, CaCo2- und Calu3- Zellen sowie einem SARS-CoV-2-D614G-, -Delta- und Omikron/BA.1-Pseudovirus getestet. Als Konzentrationsbereich wurden 100 nM, 300 nM, 1.000 nM, 3.000 nM und 10.000 nM verwendet.

4.3.4. Analyse der Inhibition durch Schwereketten-Antikörper

Gegen SARS-CoV-2 generierte Schwereketten-Antikörper auf Basis von in LamaMice isolierten Nanobodies (Eden et al. 2024) sowie die als Kontrolle verwendeten Nanobodies wurden von der AG Koch-Nolte bereitgestellt. Die Analyse der Inhibition von SARS-CoV-2-WT-Pseudoviren erfolgte im Luciferase-Assay. Die Aliquots wurden in PBS auf eine Konzentration von 10 ng/ μL verdünnt. Diese wurden daraufhin in den Verdünnungsstufen 1:10, 1:30, 1:100, 1:300, 1:1000 und 1:3000 im Vektorüberstand angesetzt, die den Konzentrationen 1000, 333, 100, 33, 10 und 3 pg/ μL entsprechen. Alle Verdünnungsstufen wurden in Triplikaten pipettiert, als Zellen wurden CaCo2 genutzt.

Im zweiten Schritt wurden die Schwereketten-Antikörper auf ihre Inhibition von SARS-CoV-2-WT- und -Omikron/BA.2-Pseudoviren untersucht. Der Assay wurde wie zuvor angesetzt, aus Gründen der schlechteren Transduzierbarkeit der CaCo2-Zellen und zur Vermeidung zellabhängiger Faktoren wurden für diese Messung HEK293T-ACE2-Zellen verwendet.

Im dritten Schritt wurde eine durch die AG Koch-Nolte getroffene Auswahl der Schwereketten-Antikörper auch auf ihre Inhibition von SARS-CoV-2-Omikron/BA.5-Pseudoviren untersucht. Hierbei wurden der Konzentrationsbereich um die Konzentrationen 10.000 und 3.333 pg/ μL erweitert, um eine möglicherweise schwächere Inhibition messbar zu machen. Verwendet wurden erneut HEK293T-ACE2-Zellen.

4.4. Mathematische Korrektur von Transduktionsraten

Transduktionsevents in Versuchen mit viralen Vektoren folgen grundsätzlich einer Poissonverteilung (Fehse et al. 2004). Da eine Analyse von Transduktionsraten mittels Durchflusszytometrie nicht in der Lage ist, multiple Transduktionen einer einzelnen Zelle zu ermitteln, kann die reine Transduktionsrate ein irreführendes Messergebnis darstellen. Bei

geringen Transduktionsraten spielt dies eine eher geringe Rolle, bei hohen Raten kann es jedoch vorkommen, dass ein großer Anteil der gemessenen Zellen mehrfach transduziert wurde und somit ein starker Unterschied zwischen der gemessenen Transduktionsrate und der Anzahl der tatsächlich erfolgten Transduktionsevents vorliegt. Dies ist besonders dann relevant, wenn das Ziel einer Messung der Vergleich verschiedener Proben ist, wie es in den in dieser Arbeit dargestellten Neutralisations- und Inhibitionsassays der Fall ist. Um die mittels durchflusszytometrischen Methoden gewonnenen Daten zu korrigieren, wurden sie daher mathematisch in die Anzahl der Transduktionsevents umgewandelt. Die allgemeine Formel für Poissonverteilungen kann, wie im Folgenden beschrieben, umgeformt werden, so dass sich daraus das Verhältnis von transduzierten Zellen und Transduktionsevents ergibt. Zunächst lässt sich die Formel für den Anteil untransduzierter Zellen ($P(X=0)$) in Abhängigkeit der Transduktionsevents (TE) und Zellzahl (N_{Zellen}) wie folgt aufstellen:

$$P(X=0) = \frac{\left(\frac{TE}{N_{Zellen}}\right)^0 * e^{-\left(\frac{TE}{N_{Zellen}}\right)}}{0!}$$

Diese Formel lässt sich wie folgt kürzen:

$$P(X=0) = \frac{1}{1} e^{-\left(\frac{TE}{N_{Zellen}}\right)}$$

Anders als – wie beschrieben – der Anteil der ein, zwei oder noch öfter transduzierten Zellen ist in durchflusszytometrischen Analysen der Anteil der untransduzierten Zellen eine zuverlässig messbare Größe. Die Formel lässt sich wie folgt umformen, dass aus dieser Größe die Rate der Transduktionsevents (TE) im Verhältnis zur Zellzahl (N_{Zellen}) ergibt:

$$\frac{TE}{N_{Zellen}} = -\ln(P(X=0))$$

Die Rate aller Transduktionsevents, die für vergleichende Versuche wichtiger ist, als der direkt messbare Anteil mindestens einmal transduzierter Zellen, ist also der negative natürliche Logarithmus des Anteils der untransduzierten Zellen. Diese Kalkulation wurde in Titrationsexperimenten mit den verwendeten Vektoren und Zellen überprüft und bestätigt und wurde in dieser Arbeit auf die durchflusszytometrisch erhobenen Messdaten angewandt, wo immer Transduktionsraten verglichen werden, beispielsweise bei der Erstellung von Dosis-Wirkungskurven von Inhibitoren der Transduktion.

5. Ergebnisse

5.1. HIV-1 Pseudovirusassay

5.1.1. Vorarbeiten: Aktivität von HIV-1 inhibierenden Substanzen

In der vorausgegangenen Arbeit (Woens 2018) wurden 31 Hits aus einem Hochdurchsatzscreening (Ellinger, 2020) validiert und auf ihren Targetmechanismus untersucht. Zum besseren Verständnis der darauf aufbauenden Arbeiten (Kapitel 5.1.2. – 5.1.4.) sind diese Vorarbeiten hier (Kapitel 5.1.1) gezeigt. Zur Validierung des Screenings wurden die Experimente unter Wechsel des Labors, des ausführenden Wissenschaftlers, des Reportergens, der Zelllinie, des Substanzbatches und des Vektor-Envelopes durchgeführt. Dabei wurden VSV-G-pseudotypisierte, eGFP exprimierende Vektoren (LeGO-G2) in PM1-Zellen benutzt, während der Hochdurchsatz-Assay eco-pseudotypisierte, Luciferase exprimierende Vektoren und HEK293T-mCAT1-Zellen benutzt hatte.

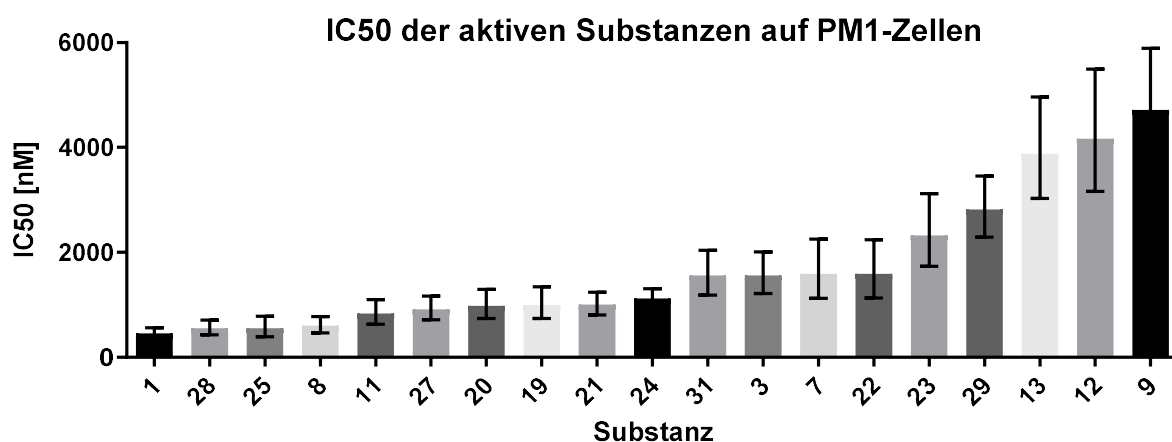


Abbildung 13: Wirkung von Substanzen aus einem HIV-1 Hochdurchsatzscreening in PM1-Zellen gegen die Transduktion mit einem eGFP exprimierenden LeGO-G2 Vektor. Dargestellt sind die IC50-Werte aller wirksamen Substanzen. Die ermittelten Werte lagen zwischen 454 nM (C1) und 4,7 µM (C9). IC50: Für eine 50%ige Inhibition notwendige Konzentration.

Die ermittelten Dose-Response-Kurven zeigten für eine 50%ige Inhibition notwendige Konzentrationen (IC50) zwischen 454 nM und 4,7 µM, wobei 19 Substanzen unter 5 µM lagen. Aufgrund von Autofluoreszenz (Substanz 9) und deutlichen toxischen Effekten (Substanz 12) wurden zwei Substanzen ausgeschlossen, sodass 17 aktive Inhibitoren übrigblieben, deren Wirkung spezifisch für die lentivirale Vektorbiologie war.

Um den Zielmechanismus der Inhibitoren genauer zu lokalisieren, wurden Vektoren mit spezifischen Mutationen im Infektionszyklus eingesetzt. Zunächst wurde ein nicht-integrierender lentiviraler Vektor (NILV) verwendet, der durch eine defekte Integrase

gekennzeichnet ist. Obwohl die erzeugte cDNA nicht in die zelluläre DNA eingebaut wird, kann sie transkribiert werden und führt zu einem messbaren, wenn auch schwachen Signal. Im zweiten Ansatz kam ein Vektor mit defekter reverser Transkriptase (NRTLTV) zum Einsatz, der gar keine cDNA produziert, aber in geringem Maße direkt analog zur mRNA translatiert wird. Aufgrund der geringen Transduktionseffizienz in PM1-Zellen wurden für diese Tests die permissiveren HEK293T-Zellen verwendet.

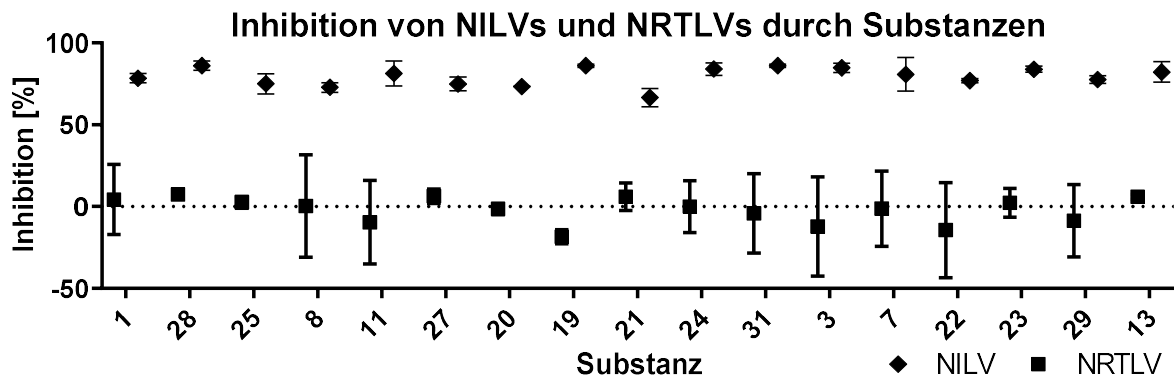


Abbildung 14: Ergebnisse der Assays mit nicht-integrierenden (NILV) und nicht-revers-transkribierenden lentiviralen Vektoren (NRTLTV). Diese Assays wurden zur Eingrenzung des Wirkmechanismus der Substanzen entlang des Replikationsprozesses durchgeführt. Die Substanzen wurden in sechsfacher Konzentration ihrer zuvor gemessenen IC₅₀ verwendet, um ein deutliches Signal zu erzielen und eine vollständige, reduzierte oder vollständig ausbleibende Wirkung voneinander zu unterscheiden. Alle gemessenen Substanzen zeigten eine Inhibition des Signals des NILV und keine messbare Inhibition des Signals des NRTLTV. Hieraus lässt sich eine Abhängigkeit von der reversen Transkription ableiten. IC₅₀: Für eine 50%ige Inhibition notwendige Konzentration.

Die 17 Substanzen wurden in sechsfacher IC₅₀-Konzentration getestet, da eine binäre Unterscheidbarkeit ihrer Aktivität erwartet wurde. Im NILV-Assay zeigten alle Substanzen eine deutliche Hemmung der Transduktion (>70%), was darauf hinweist, dass ihr Angriffspunkt vor der Integrationsphase liegt. Im NRTLTV-Assay hingegen konnte keine hemmende Wirkung beobachtet werden, sodass der Zielmechanismus der Inhibitoren innerhalb oder direkt nach der reversen Transkription liegen muss – jedoch noch vor der Integration. Zusammenfassend wurde ein Panel von 17 hochaktiven Inhibitoren (IC₅₀ < 5 µM) identifiziert, die den reversen Transkriptionsschritt des HIV-1-Lebenszyklus gezielt blockieren, ohne dass unerwünschte Nebeneffekte auf den Assay oder die Zellen erkennbar waren.

Zur weiteren Eingrenzung des Wirkmechanismus und der Interaktion mit klinisch relevanten Resistenzmutationen wurden die Substanzen auf einem neu entworfenen Panel von Vektorvarianten getestet, die gegen jeweils eine der wichtigsten Klassen antiretroviraler Medikamente resistent waren. Die IC₅₀-Werte der Medikamente gegen die resistenten Vektoren wurden absolut und als Faktor der IC₅₀ gegen Vektoren mit Wildtyp-Enzymen

berechnet. Jeder auf Arzneimittelresistenz ausgelegte Vektor benötigte eine viel höhere Dosis der verwendeten Wirkstoffe der jeweiligen Klasse.

Tabelle 4: IC50 von HIV-1-Therapeutika auf dem Wildtyp-Vektor und auf dem jeweils gegen sie entworfenen, Resistenzen tragenden Vektor. Resistenzfaktoren sind als Faktor der IC50 angegeben und mit Literaturwerten verglichen, wo vorhanden. Literatur zu INSTI-Resistenzen: (Hardy et al. 2015), zu NRTI-Resistenzen: (Vingerhoets et al. 2005; Baxter et al. 2006; Rhee et al. 2006; Azijn et al. 2010; Melikian et al. 2012), zu NNRTI-Resistenzen: (Parkin et al. 2004; Baxter et al. 2006; Melikian et al. 2012) IC50: Für eine 50%ige Inhibition notwendige Konzentration.

Medikament	Wildtyp IC50	Resistenzvektor IC50	Resistenzfaktor	Literaturwerte
INSTI		(T97A, E138K, S147G, N155H)		
Raltegravir	3,65 nM	312 nM	85,5	>150
Dolutegravir	0,63 nM	35,9 nM	57	37 - 64
NRTI		(M41L, A62V, 69 INS, L74V, M184V, L210W, T215Y)		
Azidothymidin	378 nM	21,3 µM	56,3	82 - >2400
Tenofovir d. f.	31,3 nM	66,0 nM	2,11	3,8 - 12
Lamivudin	11,4 µM	>300 µM*	>30*	5,2 - >200
NNRTI		(L100I, K103N, Y181C)		
Nevirapin	72,0 nM	93,0 µM	1290	>122 - 468
Efavirenz	1,12 nM	3,15 µM	2810	>200 - 1800
Etravirin	0,31 nM	227 nM	732	8,3 - 58
Rilpivirin	0,38 nM	90,6 nM	238	81

Die meisten Resistenzfaktoren lagen nahe an den erwarteten Werten in den für die Vektorentwicklung herangezogenen Veröffentlichungen. Darüber hinaus ließ sich bei der Behandlung der NRTI-resistenten Vektoren mit NNRTIs eine höhere Wirksamkeit beobachten, was auch umgekehrt zutraf. Dieser Effekt ist für NNRTIs in der Literatur beschrieben und unterstreicht die erfolgreiche Herstellung eines Modellvektors für resistente HI-Viren (Tozzi et al. 2004; Clark et al. 2006; Wensing et al. 2016).

Tabelle 5: IC50 von RTIs auf Vektoren mit Resistenzmutationen gegen die jeweils andere Klasse von RTI. Nevirapin und Efavirenz zeigen eine erhöhte Wirksamkeit gegen den NRTI-resistenten Vektor, während die NRTIs Azidothymidin, Tenofovir d.f. und Lamivudin eine erhöhte Wirksamkeit gegen den NNRTI-resistenten Vektor zeigen. In der Literatur ist die verstärkte Wirkung von NNRTIs auf NRTI-resistentem HIV-1 bereits beschrieben (Tozzi et al. 2004; Clark et al. 2006). IC50: Für eine 50%ige Inhibition notwendige Konzentration.

Medikament	Wildtyp IC50	Resistenzvektor IC50	Resistenzfaktor	Literaturwerte
NNRTI		NRTI-resistenter Vektor		
Nevirapin	72 nM	27,2 nM	0,38	Höhere Wirksamkeit
Efavirenz	1,12 nM	0,21 nM	0,19	Höhere Wirksamkeit
NRTI		NNRTI-resistenter Vector		
Azidothymidin	378 nM	63,6 nM	0,17	Keine Angaben
Tenofovir d. f.	31 nM	6,6 nM	0,21	Keine Angaben
Lamivudin	11,4 µM	224 nM	0,02	Keine Angaben

Zuletzt wurden die Substanzen jeweils in einer einzelnen Dosis entsprechend ihrer IC50 auf Wildtyp-Vektor gegen alle resistenten Vektoren getestet. In diesem Versuch zeigten alle untersuchten Substanzen das gleiche Muster von Aktivitätsveränderungen. Die Hemmung

des wt- und INSTI-resistenten Vektors war vergleichbar. Auf dem NNRTI-resistenten Vektor war die Aktivität sehr gering bis gar nicht vorhanden, während sie auf dem NRTI-resistenten Vektor für alle Substanzen drastisch anstieg. Dieses Muster ist das für NNRTIs typische.

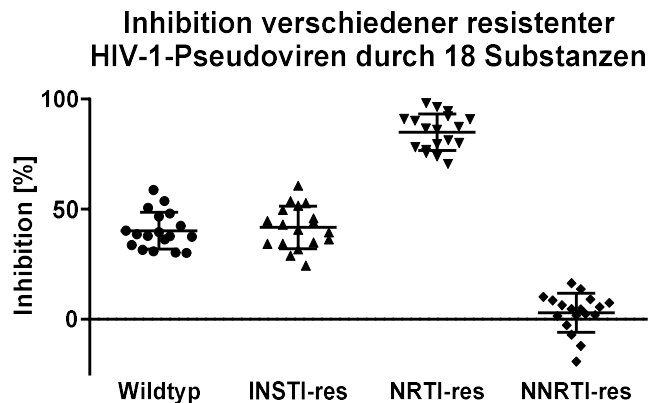


Abbildung 15: Inhibition der verschiedenen Vektoren durch die Substanzen, dosiert entsprechend ihrer IC₅₀-Werte auf dem Wildtyp-Vektor. Die Wirkung auf dem INSTI-resistenten Vektor unterscheidet sich nicht signifikant von der Wirkung auf dem WT-Vektor. Die Inhibition des NRTI-resistenten Vektors war stark erhöht, während die Inhibition des NNRTI-resistenten Vektors drastisch reduziert war. Dieses Muster gilt für alle Substanzen. IC₅₀: Für eine 50%ige Inhibition notwendige Konzentration.

5.1.2. Vergleich der Testsubstanzen mit zugelassenen Therapeutika

Um einen besseren Vergleich der Substanzen und zugelassener Therapeutika hinsichtlich ihrer Aktivität auf NNRTI-resistente Vektoren zu ermöglichen, wurden die fünf Substanzen mit der höchsten gemessenen Restaktivität bei ihrer WT-IC₅₀ einer detaillierteren Analyse unterzogen. Diese bestand im Messen einer Dosis-Wirkungskurve über die Konzentrationen von 30 nM bis 10 µM gegen den Wildtyp-Vektor und über die Konzentrationen von 100 nM bis 30 µM gegen den NNRTI-resistenten Vektor. Als Zellen wurden HEK293T verwendet.

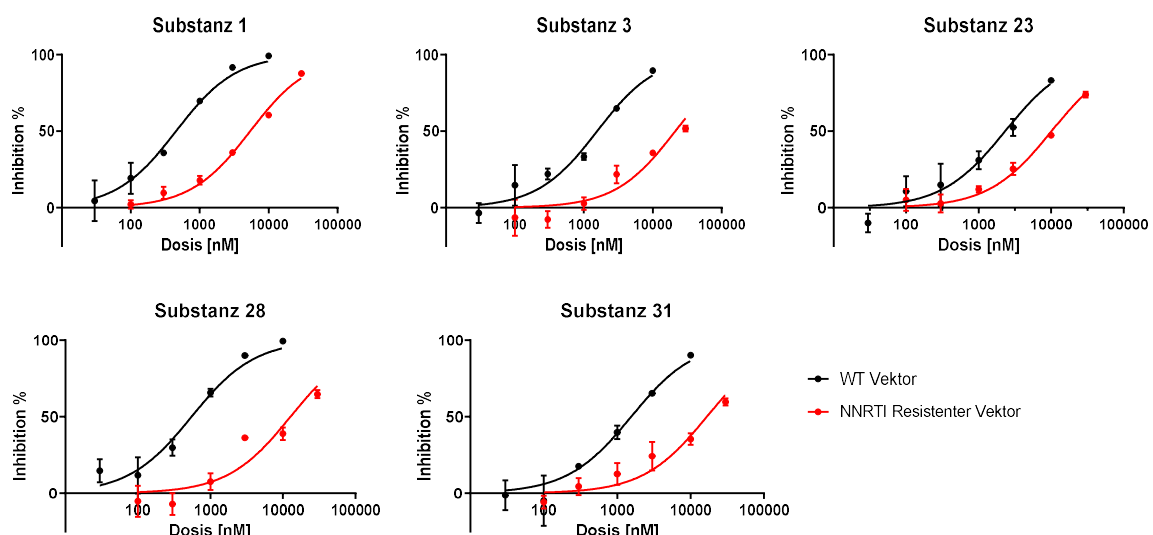


Abbildung 16: Vergleich der inhibitorischen Aktivität von 5 ausgewählten Substanzen (C1, C3, C23, C28, C31) gegen die Transduktion von HEK293T-Zellen mit einem Wildtyp-Vektor und dem NNRTI-resistenten Vektor. Die mit dem Wildtyp-Vektor transduzierten Zellen wurden mit den Substanzen in den Konzentrationen 30 nM – 10 µM behandelt, die mit dem NNRTI-resistenten Vektor transduzierten Zellen mit den Konzentrationen 100 nM – 30 µM. Alle Substanzen zeigten eine verringerte dosisabhängige Wirkung gegen den NNRTI-resistenten Vektor. IC₅₀: Für eine 50%ige Inhibition notwendige Konzentration.

Die so erhaltenen IC₅₀-Werte ergaben Resistenzfaktoren zwischen 4,4 und 23,1 des Vektors gegen die Substanzen 1, 3, 23, 28 und 31. Diese Resistenzwerte sind deutlich niedriger als die Faktoren, die bei den von der FDA zugelassenen NNRTIs beobachtet wurden, die zwischen 238 und 2810 lagen. Mit absoluten IC₅₀-Werten zwischen 5,42 und 21,27 μ M sind die Substanzen sogar wirksamer als Nevirapin, ein ausgereiftes, chemisch optimiertes und von der FDA zugelassenes Medikament, das bei dieser Kombination von Resistenzmutationen erst bei 93 μ M eine 50%ige Hemmung erreicht.

Tabelle 6: IC₅₀ der Substanzen 1, 3, 23, 28 und 31 im Assay mit dem Wildtyp-Vektor und dem NNRTI-resistenten Vektor sowie berechnete Resistenzfaktoren. IC₅₀: Für eine 50%ige Inhibition notwendige Konzentration.

	Wildtyp IC ₅₀	NNRTI-resistenz IC ₅₀	Resistenzfaktor
Substanz 1	454 nM	5,4 μ M	11,9
Substanz 3	1563 nM	21,3 μ M	13,6
Substanz 23	2324 nM	10,2 μ M	4,4
Substanz 28	551 nM	12,7 μ M	23,1
Substanz 31	1556 nM	16,7 μ M	10,7

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unser Test zur Identifizierung von mindestens fünf hochaktiven Leitstrukturen für HIV-1-Medikamente geführt hat, die zur Klasse der NNRTIs gehören, aber eine sehr geringe Anfälligkeit für bekannte Resistenzmutationen aufweisen.

5.1.3. ADME/PK Analyse der vielversprechendsten Substanzen

Zur Untersuchung weiterer für die Verwendung als Leitstruktur relevanter Eigenschaften wurde eine Reihe externer Assays bei der Firma Cyprotex (UK) durchgeführt. Dabei wurden die hydrophile Löslichkeit, die Stoffwechselstabilität in humanen Mikrosomen und die Plasmaproteinbindung untersucht.

Tabelle 7: Ergebnisse der extern durch Cyprotex durchgeführten Assays. Es wurde ein turbidimetrischer Löslichkeitsassay für die Wasserlöslichkeit, ein (Human-Leber-)mikrosomaler Stoffwechselstabilitätsassay und ein Equilibrium-Dialyse-Assay zur Bestimmung der Plasmabindung der Substanzen durchgeführt.

Substanz	Wasserlöslichkeit	Mikrosomale Stoffwechselstabilität		Plasmaproteinbindung	
	Löslichkeit (μ M)	Clearance (μ l/min/mg protein)	Halbwertszeit (min)	Ungebundene Fraktion	Recovery
1	10,5	1670	0,830	1%	104%
3	65	1020	1,36	2%	99,8%
23	>100	62,1	22,3	17%	106%
28	65	274	5,05	2%	106%
31	20	33,4	41,5	5%	109%

Alle Substanzen zeigten eine Wasserlöslichkeit von >10 μ M, Substanz 23 war auch oberhalb von 100 μ M noch löslich. Die Geschwindigkeit der Clearance im mikrosomalen Stoffwechsel-

Assay unterschied sich stark, die Halbwertszeit der Substanzen umfasst die Spanne von unter einer Minute bei Substanz 1 bis zu über 40 Minuten im Fall von Substanz 31. Der Anteil der nicht an Plasmaprotein gebundenen Fraktion unterschied sich ebenfalls deutlich, während Substanz 1 nur zu 1% ungebunden vorlag, war Substanz 23 zu 17% ungebunden.

5.1.4. Toxizitätsassay für Testsubstanzen und HIV-1-Medikamente

Zur Untersuchung einer möglichen Toxizität der fünf beschriebenen Substanzen wurde ein Toxizitätsassay mit stabil Luciferase exprimierenden HEK293T-Zellen durchgeführt. Die Substanzen in Konzentrationen von 100 nM, 300 nM, 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M und 30 μ M hinzugegeben, was für alle Substanzen die IC₅₀ auf WT-Vektor sowie die IC₅₀ auf dem NNRTI-Resistenzvektor abdeckt. Zum Vergleich wurden die HIV-1-Therapeutika Efavirenz, Raltegravir, Nevirapin und Dolutegravir in denselben Konzentrationen verwendet. Als Positivkontrolle wurden die Antibiotika Zeocin und Blastidicin verwendet.

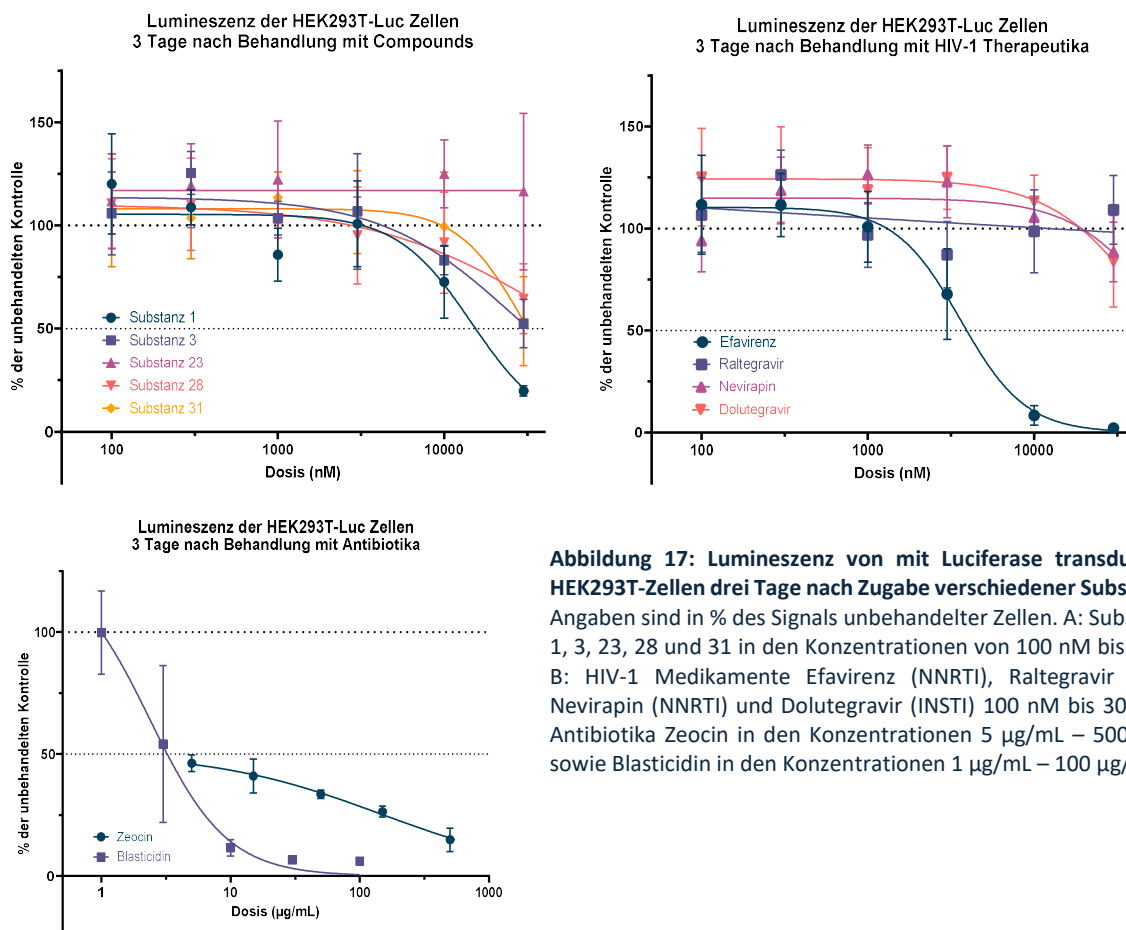


Abbildung 17: Lumineszenz von mit Luciferase transduzierten HEK293T-Zellen drei Tage nach Zugabe verschiedener Substanzen. Angaben sind in % des Signals unbehandelter Zellen. A: Substanzen 1, 3, 23, 28 und 31 in den Konzentrationen von 100 nM bis 30 μ M. B: HIV-1 Medikamente Efavirenz (NNRTI), Raltegravir (INSTI), Nevirapin (NNRTI) und Dolutegravir (INSTI) 100 nM bis 30 μ M. C: Antibiotika Zeocin in den Konzentrationen 5 μ g/mL – 500 μ g/mL sowie Blastidicin in den Konzentrationen 1 μ g/mL – 100 μ g/mL.

Bei den Substanzen lässt sich bis auf C23 eine Verringerung der Lumineszenz ab einer Konzentration von 10 μ M feststellen. Nur Substanz 1 verringert das Signal um mehr als 50%, auf 19,3% bei einer Konzentration von 30 μ M. Die HIV-1-Therapeutika zeigen ein ähnliches

Spektrum: Raltegravir zeigt im Konzentrationsbereich keine signifikante Reduktion des Luciferase-Signals, bei Nevirapin und Dolutegravir ist eine sehr schwache Reduktion zu erkennen, die Slope der Dosis-Wirkungskurve beginnt bei 10 μM und bleibt auch bei 30 μM oberhalb von 75%. Efavirenz zeigt jedoch bereits ab 3 μM eine Signalschwächung und erreicht bei 10 μM bereits einen Signalwert von nur noch 8,33% der unbehandelten Kontrolle. Die Wirkung der als Kontrolle verwendeten Antibiotika ist deutlich zu erkennen, Zeocin hemmt das Signal bereits in der niedrigsten Konzentration um mehr als 50%, Blasticidin zeigte eine deutliche Kurve die sich im verwendeten Konzentrationsbereich bereits stark der 0 nähert. Die in der Lumineszenz sichtbaren Effekte ließen sich anhand der Färbung des Nährmediums bestätigen, die Wells mit niedrigem Signal hoben sich auch klar von den restlichen Wells ab, was einer Interferenz mit dem Marker widerspricht und auf einen genuine Effekt auf die Zellaktivität hinweist.

Bei der Messung an Tag 3 wurde den Wells frisches Medium hinzugefügt und die Substanzen zur Aufrechterhaltung der Zielkonzentration ebenfalls hinzugegeben. Nach drei weiteren Tagen wurde erneut Luciferin hinzugegeben und die Lumineszenz gemessen, um einen zeitlichen Verlauf von zytotoxischer/zytostatischer Wirkung zu messen. Erneut wurden Dosis-Wirkungskurven erstellt.

Wie in Abbildung 18 zu sehen, zeigen sich die schon an Tag 3 beobachteten Effekte bei den meisten Substanzen erneut in ähnlicher Höhe. Die Substanzen erreichen bei sehr ähnlichen Konzentrationen eine Verringerung des Signals von 50%, wie auch in Tabelle 8 gezeigt. Eine Veränderung der Hemmung ist bei den HIV-1-Medikamenten Dolutegravir und Nevirapin sowie den beiden Antibiotika Zeocin und Blasticidin zu erkennen. Die 6d-IC₅₀ liegt bei Dolutegravir mit 7,6 μM um einen Faktor 7,4 niedriger als die 3d-IC₅₀, bei Nevirapin in der Unterschied ein Faktor von 2. Blasticidin verringert das Signal an Tag 6 bereits bei 1,3 $\mu\text{g/mL}$ um 50%, während es an Tag 3 2,4 $\mu\text{g/mL}$ für diesen Effekt benötigt. Für Zeocin ist der Effekt so stark, dass sich kein Faktor berechnen lässt, bereits bei 5 $\mu\text{g/mL}$ liegt das Signal an Tag 6 bei 2,3% der Kontrolle, während es an Tag 3 selbst bei 500 $\mu\text{g/mL}$ noch bei 14,9% lag.

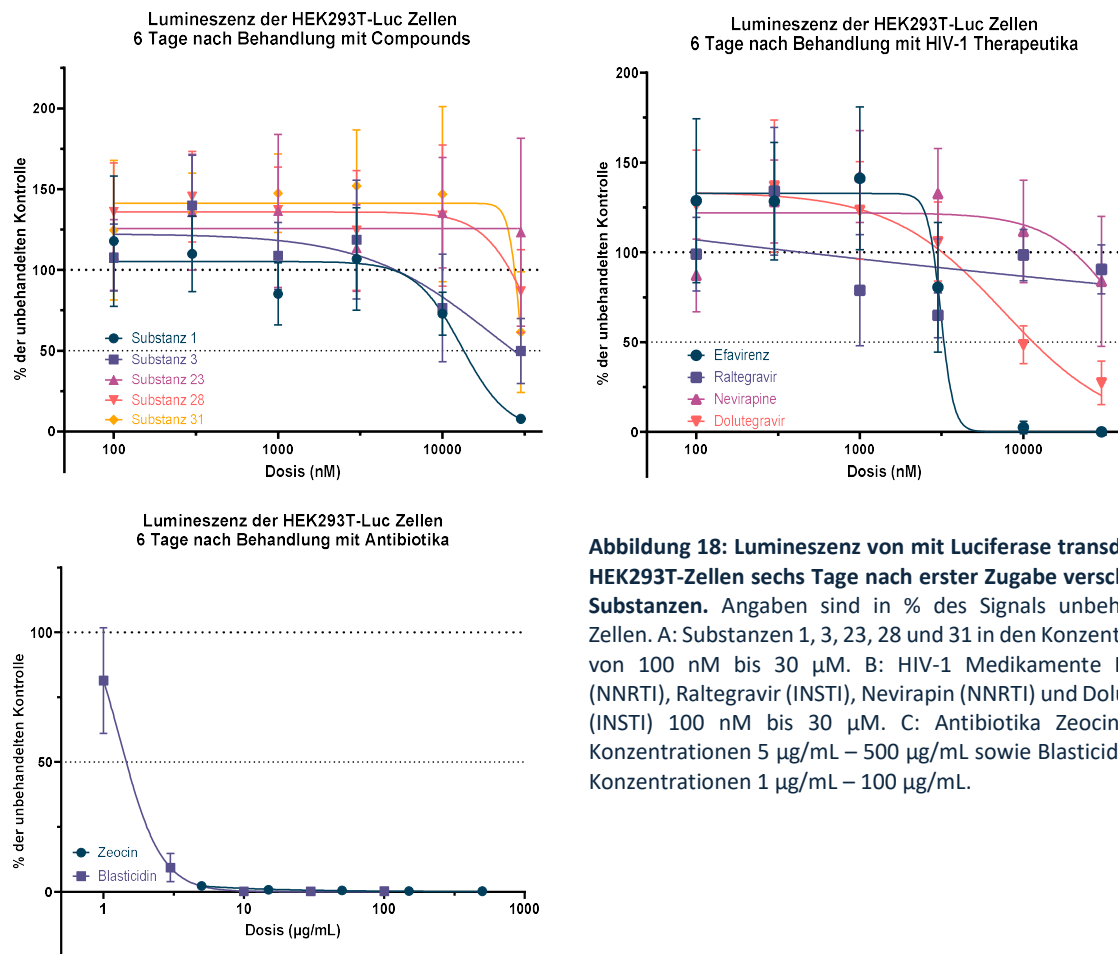


Abbildung 18: Lumineszenz von mit Luciferase transduzierten HEK293T-Zellen sechs Tage nach erster Zugabe verschiedener Substanzen. Angaben sind in % des Signals unbeehandelter Zellen. A: Substanzen 1, 3, 23, 28 und 31 in den Konzentrationen von 100 nM bis 30 µM. B: HIV-1 Medikamente Efavirenz (NNRTI), Raltegravir (INSTI), Nevirapine (NNRTI) und Dolutegravir (INSTI) 100 nM bis 30 µM. C: Antibiotika Zeocin in den Konzentrationen 5 µg/mL – 500 µg/mL sowie Blastidicin in den Konzentrationen 1 µg/mL – 100 µg/mL.

Wie an den Dosis-Wirkungskurven und den errechneten IC₅₀-Werten für die Lumineszenz zu erkennen ist, haben einige der Substanzen bei hohen Konzentrationen einen messbaren Einfluss auf das Wachstum der Zellpopulationen. Von den eingegebenen Testsubstanzen haben C1, C3, C23 und C31 eine Hemmung um 50% nach drei und sechs Tagen zwischen 10 und 30 µM. Die toxische Wirkung der verwendeten HIV-1-Therapeutika liegt nach 3 Tagen nur für Efavirenz im Bereich der eingegeben Konzentrationen und mit 2,7 µM ist sie dabei niedriger als alle experimentellen Substanzen. An Tag 6 ist auch Dolutegravir mit 7,6 µM bei einer Dosis für eine 50%ige Reduktion des Signals verantwortlich, die unterhalb der bei den experimentellen Substanzen gemessenen liegt. Dolutegravir hat dabei eine deutliche Reduktion der IC₅₀ von Tag 3 auf Tag 6 zu verzeichnen, ein Effekt der bei anderen Substanzen nicht oder, wie bei Nevirapine, nur in geringem Maße zu verzeichnen ist.

Tabelle 8: Berechnete IC50-Werte für alle Substanzen an Tag 3 und Tag 6. Für Substanz 23 und Raltegravir lässt sich kein Wert berechnen, da selbst bei der höchsten Konzentration von 30 µM keine ausreichende Hemmung messbar ist. *Bei Substanz 28, Nevirapin und Dolutegravir (nur Tag 3) liegen die von PRISM8 errechneten Werte oberhalb der tatsächlich gemessenen Konzentrationen. IC50: Für eine 50%ige Inhibition notwendige Konzentration.

Molekül	IC50 3d	IC50 6d
Substanz 1	12,1 µM	13,1 µM
Substanz 3	27,4 µM	19,6 µM
Substanz 23	NA	NA
Substanz 28	33,7 µM*	36,4 µM*
Substanz 31	24,8 µM	29,4 µM
Efavirenz	2,7 µM	3,1 µM
Raltegravir	NA	NA
Nevirapin	90 µM*	45 µM*
Dolutegravir	56 µM*	7,6 µM
Zeocin	< 5 µg/mL	<< 5 µg/mL
Blasticidin	2,4 µg/mL	1,3 µg/mL

5.2. SARS-CoV-2 Pseudovirusassay

Der zweite Teil der Ergebnisse behandelt die Anwendung des Pseudovirusassays auf SARS-CoV-2. Hierzu wurden zunächst die notwendigen, mit dem SARS-CoV-2 Spikeprotein pseudotypisierten Vektoren (im Weiteren aus Gründen der Lesbarkeit SARS-CoV-2-Pseudoviren genannt) hergestellt und bezüglich ihrer Transduktionsfähigkeit optimiert. Zusätzlich wurde eine hoch permissible, ACE2-exprimierende Linie von HEK293T-Zellen etabliert. In dieser Kombination ließen sich deutlich stärkere Signale durch die effizientere Transduktion der Zellen mit den Firefly-Luciferase oder eGFP exprimierenden Pseudoviren erzielen und mithin ein größerer Dynamikbereich des Assays erreichen, während gleichzeitig die hierzu notwendige Menge an eingesetzten Pseudoviren stark reduziert wurde. Der Assay wurde zunächst angewendet, um die Neutralisation des Pseudovirus durch Antikörper im Serum von auf verschiedene Weise gegen SARS-CoV-2 immunisierten Personen zu testen. Weiterhin wurden mit ihm (potenzielle) Therapeutika im Rahmen von Drug-Repurposing Versuchen untersucht, darunter vor allem der selektive Östrogenrezeptormodulator Raloxifen. Zuletzt wurden neu generierte Schwereketten-Antikörper auf ihre Fähigkeit zur Neutralisation und damit auf ihre Eignung als antivirales Therapeutikum untersucht. Hierzu wurden die Pseudoviren mit den Envelopes neuer Varianten von SARS-CoV-2 pseudotypisiert, um eine Wirksamkeit im Kontext des fortwährend mutierenden Virus zu überprüfen.

5.2.1. Herstellung von lentiviralen SARS-CoV-2-Pseudoviren

Zur Etablierung des SARS-CoV-2-Pseudovirusassays wurden zunächst die SARS-CoV-2-Pseudoviren, also lentivirale Vektoren mit dem SARS-CoV-2-Spikeprotein als Envelope hergestellt. Das Plasmid zur Expression des Spikeproteins wurde im ersten Schritt anhand der Wildtyp-Sequenz (WT) synthetisiert und verwendet. Im Verlauf der Arbeiten wurden Modifikationen sowohl zugunsten der Assayfunktion als auch analog zu relevanten Mutationen des SARS-CoV-2-Spikeproteins in den pandemischen Wellen eingefügt. Diese wurden zu Beginn in das vorliegende Spike-codierende Plasmid per PCR kloniert und im weiteren Verlauf, wenn vorliegend, von Addgene bestellt oder neu synthetisiert (wie im Fall der Variante B.1.1.7). Zu den wichtigsten Modifikationen im Sinne der Assayfunktion gehörte dabei die Deletion von 18-19 Aminosäuren am C-Terminus (d18 / d19). Diese Deletion wurde in das Spikeprotein der D614G-Variante kloniert und mit Pseudotypen beider Varianten (D614G in voller Länge und als d19-Variante) wurden CaCo2-Zellen transduziert.

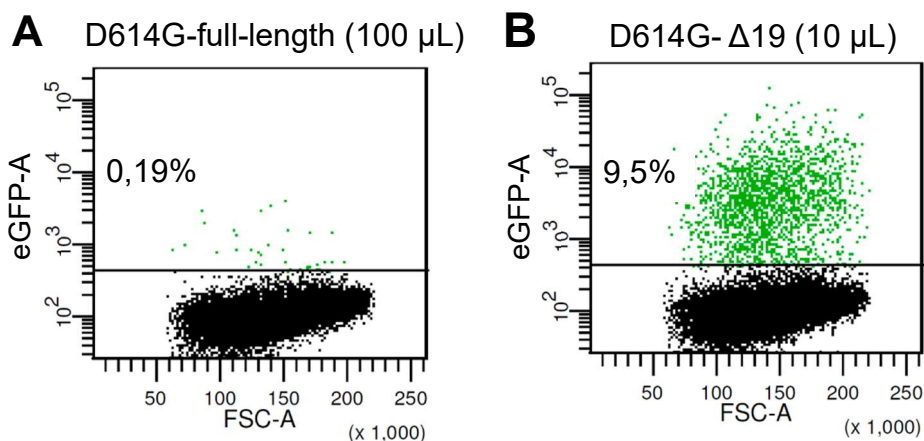


Abbildung 19: Exemplarische durchflusszytometrische Messung der Transduktionsrate zweier SARS-CoV-2-Pseudoviren in CaCo2-Zellen. Gemessen wurde das eGFP-Signal. Plot A zeigt die Messung von CaCo2-Zellen, die mit 100 µL Pseudovirus transduziert wurden, pseudotypisiert mit dem D614G-Spikeprotein in voller Länge. Hierdurch ließ sich eine Transduktionsrate von 0,19% der Zellen erreichen. Plot B zeigt die Messung von CaCo2-Zellen, die mit 10 µL eines Pseudovirus transduziert wurden, bei dem das D614G-Spikeprotein die d19-Deletion enthielt. Hierbei ließ sich eine Transduktionsrate von 9,5% messen. Dies stellte eine Steigerung des Titors um den Faktor 500 dar.

Wie in Abbildung 19 zu erkennen, führte die Deletion der 19 Aminosäuren zu einer drastischen Steigerung der Transduktionsrate. Im dargestellten Beispiel ließen sich mit 100 µL Überstand des ungekürzten D614G-Pseudovirus nur 0,19% der CaCo2-Zellen transduzieren, während das Pseudovirus mit der Deletion mit nur 10 µL 9,5% der Zellen transduzierte, also etwa die 50-fache Transduktionsrate bei einem Zehntel des Volumens erreichte, eine effektive Erhöhung des Titors um einen Faktor von etwa 500. Im weiteren Verlauf wurden ausschließlich in dieser Weise optimierte Pseudoviren verwendet, die hierzu

eingefügten d18/d19-Modifikationen werden dabei nicht genannt. D614G-d19-Pseudoviren werden beispielsweise fortan nur als D614G-Pseudoviren bezeichnet.

5.2.2. Herstellung von stark ACE2-exprimierenden HEK293T-Zellen

Um einen Assay mit möglichst starkem Signal zu erhalten, wurde eine für die SARS-CoV-2-Pseudoviren hoch permissive Zelllinie etabliert. Hierzu wurden HEK293T-Zellen mit 100 µL des Vektors pRRL.sin.ppt.SFFV.Ace2.IRES.Puro.wPRE transduziert und zur Selektion 21 Tage mit 1 µg/mL Puromycin behandelt. Daraufhin wurden sie mit einer an PE gekoppelten SARS-CoV-2-Spike-Rezeptorbindungsdomäne (RBD-PE) angefärbt und im FACS Aria IIIu Durchflusszytometer auf hohe ACE2-Expression sortiert. Die Zellen wurden dabei einzeln in einer 96-Well Platte abgelegt, um von Einzelzellen stabile Klone auswachsen zu lassen. Die entstandenen Zellen werden im weiteren als HEK293T-ACE2 bezeichnet.

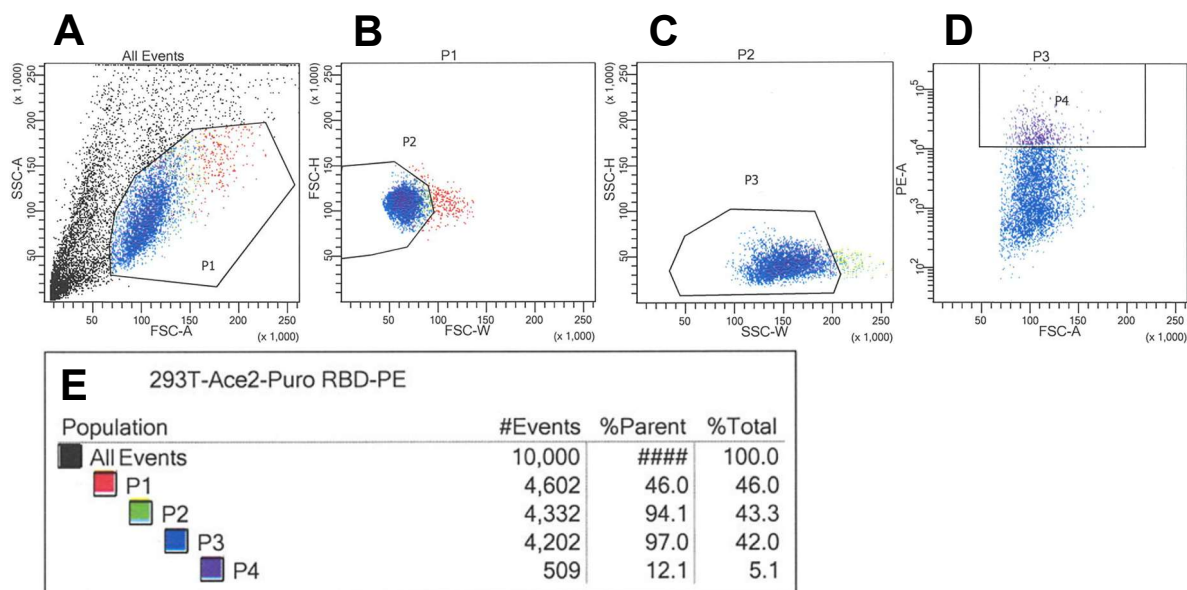


Abbildung 20: Strategie der durchflusszytometrischen Sortierung stark ACE2-exprimierender HEK293T-Zellen im FACS Aria IIIu. A zeigt die Selektion lebender Zellen nach den Kategorien SSC-A und FSC-A. In B werden Zellen mit zu hohen FSC-W Werten ausgeschlossen. In C werden Zellen mit abweichendem SSC-W Wert ausgeschlossen. In D werden die 12,1% der verbliebenen Population mit dem stärksten PE-Signal (P4) zum Sortieren ausgewählt. Der PE-Marker ist an die Spike-RBD gekoppelt, die den ACE2-Rezeptor bindet. Die Selektion erfolgt also aufgrund von starker Bindung der RBD als Marker für hohe Expression von ACE2.

Die Transduktion der so hergestellten monoklonalen Linien wurde mit einem Luciferase-exprimierenden SARS-CoV-2-D614G-Pseudovirus getestet und der am effizientesten transduzierbare Klon 2G7 wurde für zukünftige Experimente ausgewählt.

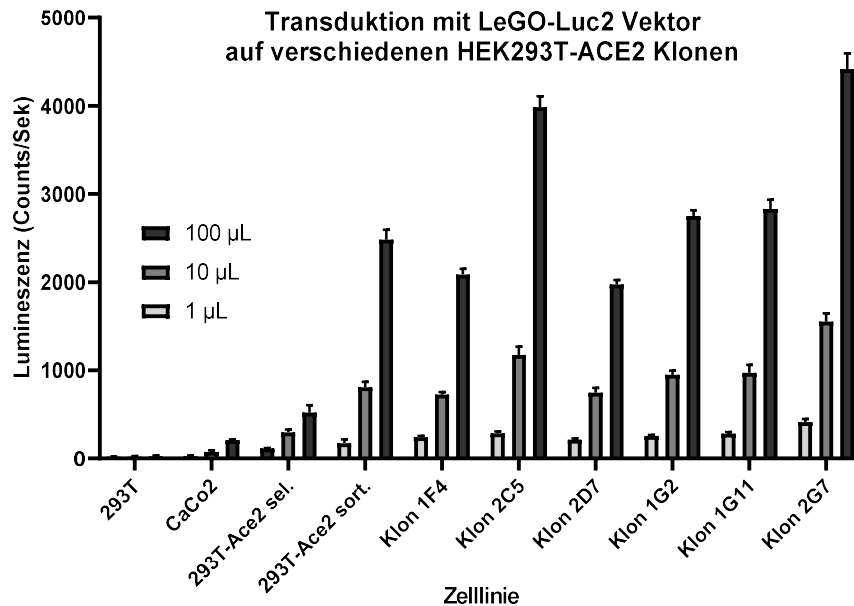


Abbildung 21: Transduktion verschiedener ACE2-exprimierender Klone von HEK293T-Zellen. Als Kontrollen dienen untransduzierte HEK293T-Zellen, natürlich ACE2-exprimierende CaCo2-Zellen und die Gesamtpopulationen (Massenkultur) der transduzierten HEK293T-Zellen nach der Selektion mit Puromycin sowie nach der Sortierung (siehe Abb. 20) auf die 12,1% mit dem stärksten PE-Signal. Ausgewählt worden waren die HEK293T-ACE2-Klone 1F4, 2D7, 1G2, 1G11 und 2G7. Dargestellt sind die mittels Lumineszenz gemessenen Transduktionssignale nach Zugabe von je 1, 10 und 100 µL des Vektors LeGO-Luc2, einem Luciferase-exprimierendem SARS-CoV-2-D164G-Pseudovirus. Klon 2G7 zeigte über alle Vektorvolumina das stärkste Lumineszenz-Signal und wurde für zukünftige Versuche ausgewählt.

5.2.3. Neutralisation von SARS-CoV-2-Pseudovirus durch Serum

Zur Analyse der neutralisierenden Antikörper im Serum von Personen mit verschiedenen Arten und unterschiedlicher Anzahl von Antigenkontakten wurde SARS-CoV-2-Pseudovirus mit verschiedenen Serumverdünnungen ko-inkubiert und auf HEK293T-ACE2-Zellen gegeben. Zu den möglichen Antigenkontakten gehörten Impfungen (mRNA- und Vektorimpfstoffe verschiedener Hersteller), Infektionen mit SARS-CoV-2 und Kombinationen von Impfung und Infektion. Diese Versuche hatten die Überprüfung des Assays selbst, die Analyse der Immunität der jeweiligen Personen und das Nachvollziehen von Prozessen wie der Affinitätsreifung und des Nachlassens des Antikörperspiegels mit Abstand zur Antigenexposition („waning“) zum Zweck. In den Versuchen wurde das Spikeprotein der Virusvariante D614G verwendet, die in Europa zu Beginn der Pandemie lange die dominante Variante war.

5.2.3.1. Neutralisation durch Seren im Verlauf des Impfprotokolls

Um die durch Impfungen angestrebte, schützende Wirkung zu entfalten, müssen Antikörper nicht nur in ausreichender Quantität vorliegen. Entscheidend ist ihre Fähigkeit zur Neutralisation des Virus, die unter anderem eine hohe Bindungsaffinität an für die Infektion entscheidende Virusepitope bedingt. Daher ist eine direkte Messung der Neutralisationsfähigkeit von Antikörpern im Verlauf der Immunisierung mittels Impfung nötig, um deren gewünschte Wirkung nachzuvollziehen. Um die Eignung des Assays zu überprüfen, wurde er zur Testung einer Reihe von Serumproben von Personen im Laufe ihres Impfprotokolls verwendet. Unter den Personen waren solche, die ihre Erstimpfung mit dem Vektorimpfstoff Vaxzevria von AstraZeneca (nachfolgend AZ) erhalten hatten sowie mit dem mRNA-Impfstoff Comirnaty von BioNTech/Pfizer (nachfolgend BNT) erstgeimpfte Personen. Ab der Zweitimpfung war nur BNT verwendet worden. Die Serumproben bestanden aus einer Probe direkt am Tag der ersten Impfung, 21 Tage (BNT) oder 28 Tage (AZ) nach der ersten Impfung, je 7 Tage und 6 Monate nach der zweiten Impfung und erneut 7 Tage nach der dritten Impfung. Als Positivkontrolle wurde der monoklonale, neutralisierende Nanobody VHH-72 benutzt.

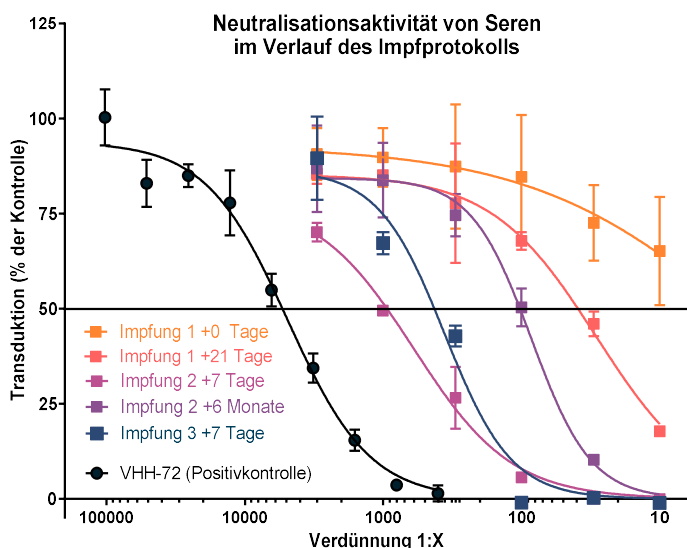


Abbildung 22: Neutralisation von SARS-CoV-2-Pseudovirus durch Serum einer geimpften Person auf HEK293T-ACE2 Zellen. Das Serum wurde zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach der Immunisierung getestet. Als Positivkontrolle diente der neutralisierende Nanobody VHH-72. Am Tag der ersten Impfung zeigt sich als Hintergrund eine geringe Hemmung der Pseudoviren, eine 50%ige Neutralisation wird nicht erreicht. 21 Tage nach der ersten Impfdosis wird ein NT50 von 1:29 erreicht. Zwei Wochen nach der zweiten Impfdosis verbessert sich die Neutralisationsfähigkeit erheblich, mit einem NT50 von 1:601. Sechs Monate nach der zweiten Dosis wird nur noch ein NT50 von 1:84 erreicht. Nach der dritten Impfdosis erhöht sich der NT50 wieder auf 1:358. (NT50: Titer für eine 50%ige Neutralisation).

Abbildung 22 zeigt den Verlauf des Impftiters in Abhängigkeit von den verabreichten Impfdosen und der Zeit am Beispiel einer einzelnen Person. Aus organisatorischen Gründen wurde die erste Probe am Tag der ersten Impfdosis (Impfung 1, Tag 0; IOT1) erst direkt nach

der erfolgten Impfung genommen, eine bereits im Serum feststellbare Wirkung ist in diesem Zeitraum jedoch ausgeschlossen. Es handelt sich also in der Praxis um die ungeimpfte Serumprobe. In dieser Probe wurde auch bei der niedrigsten Verdünnung von 1:10 keine 50%ige Neutralisation erreicht. 21 Tage nach der ersten Impfung (I1T21) lag der Titer für eine 50%ige Neutralisationstiter (NT50) bei 1:29. 7 Tage nach der zweiten Impfung (I2T7) betrug der NT50 bereits 1:601 und nach 6 Monaten ohne weiteren bekannten Antigenkontakt (I2M6) wurde ein NT50 von 1:84 gemessen.

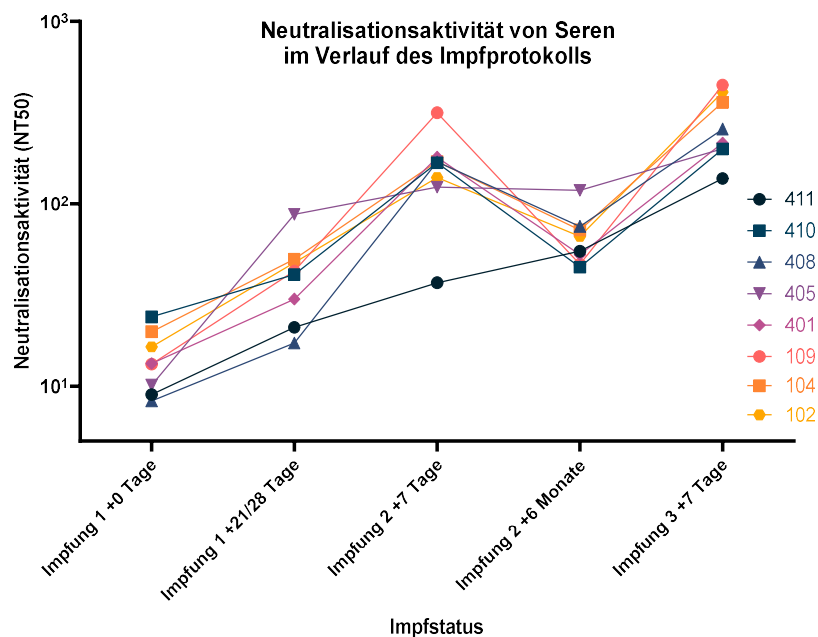


Abbildung 23: Neutralisationsaktivität von Seren geimpfter Personen im Verlauf des Impfprotokolls auf HEK293T-ACE2-Zellen. Die neutralisierenden Titer der getesteten Seren liegen vor einer Impfung unter einem NT50 von 1:30, steigen nach der ersten Dosis leicht und nach der zweiten Dosis stark an. Nach 6 Monaten ohne bekannten Antigenkontakt ist in den meisten Fällen eine Verringerung des NT50 zu erkennen, nach der dritten Impfdosis steigt der NT50 wieder an. (NT50: Titer für eine 50%ige Neutralisation).

In Abbildung 23 ist der Verlauf der Neutralisation durch die Seren über das Impfprotokoll für 8 Personen gesammelt dargestellt. Die Neutralisationsaktivität liegt zunächst für alle Proben unter einem NT50 von 1:30. Mit der Anzahl der Antigenkontakte steigt sie kontinuierlich an, sinkt zwischen der Messung kurz nach der zweiten Impfung und der Messung etwa 6 Monate später in allen Proben bis auf 411 und steigt dann wieder in allen Proben nach der dritten Impfung. Probe 411 zeigt eine besonders geringe Steigerung des Neutralisationstiters direkt nach der zweiten Impfung und als einzige Probe eine erneute Steigerung in der Messung 6 Monate nach der zweiten Impfung.

5.2.4. Inhibition der Transduktion durch therapeutische Substanzen

Neben der Analyse von neutralisierenden Antikörpern im Serum wurden auch verschiedene potenziell therapeutisch verwendbare Substanzen auf ihre Inhibition von SARS-CoV-2-Pseudoviren untersucht. Dazu gehört eine Reihe synthetisierter Peptide aus einem Screening, die von der Arbeitsgruppe von Prof. Vincenzo Summa (Universität Neapel Federico II) und dem Fraunhofer IME (siehe Kapitel 3.2.) zur Verfügung gestellt wurden, sowie ein Panel von 20 Substanzen aus einem Hochdurchsatzscreening einer Drug-Repurposing-Library (Ellinger et al. 2021). Aus letzterem Panel wurde das Medikament Raloxifen als vielversprechender Kandidat für weitere Tests im Rahmen des Drug-Repurposing-Ansatzes untersucht.

5.2.4.1. Inhibition durch neutralisierende Peptide

Ein Panel aus von der Universität Neapel Federico II und dem Fraunhofer IME entwickelten Peptiden wurde auf HEK293T-ACE2-Zellen und CaCo2-Zellen bezüglich ihrer Inhibition von SARS-CoV-2-Pseudoviren getestet.

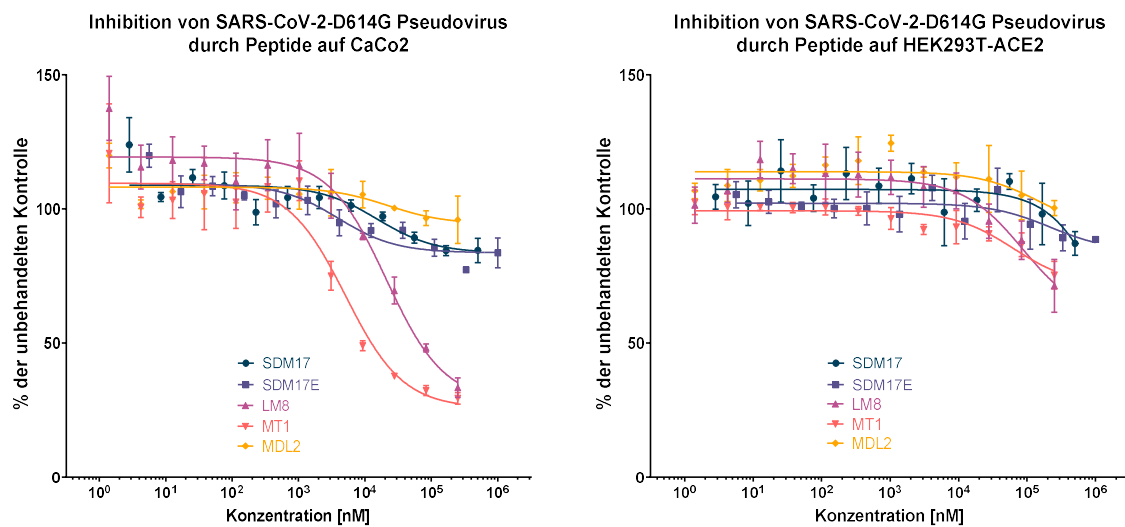


Abbildung 24: Neutralisation der Pseudoviren durch Peptide auf CaCo2-Zellen und HEK293T-ACE2-Zellen. Die Auswertung erfolgte mittels luminometrischer Messung des Signals der von transduzierten Zellen exprimierten Luciferase. Die Werte sind in % des Signals der Kontrolle ohne Inhibitor angegeben. Nur MT1 und LM8 erreichten eine kalkulierbare IC₅₀ (13 µM bzw. 50 µM) und nur bei Verwendung von CaCo2-Zellen im Assay. IC₅₀: Für eine 50%ige Inhibition notwendige Konzentration.

Wie in Abbildung 24 zu sehen ist, erreichten die Peptide MT1 und LM8 im Versuch mit CaCo2-Zellen eine Inhibition von 50% bei einer Konzentration von 13 µM bzw. 50 µM. Bei der Anwendung auf HEK293T-ACE2-Zellen erreichte keines der Peptide im verwendeten Konzentrationsbereich eine Inhibition von 50% oder mehr. MT1 und LM8 zeigen jedoch auch hier die im Vergleich stärkste Inhibition.

5.2.4.2. Testung niedermolekularer Inhibitoren von SARS-CoV-2

Ein aus einem Hochdurchsatzscreening potenzieller niedermolekularer SARS-CoV-2-Inhibitoren hervorgegangenes Panel von Substanzen (Ellinger et al. 2021) wurde zunächst in einer einzelnen Dosis von 10 μ M auf seine Inhibition der Transduktion mittels Pseudoviren untersucht. Zusätzlich wurde auch mittels CellTiter-Glo das Zellüberleben unter Behandlung mit derselben Dosis untersucht, um Hinweise auf Toxizität zu erhalten.

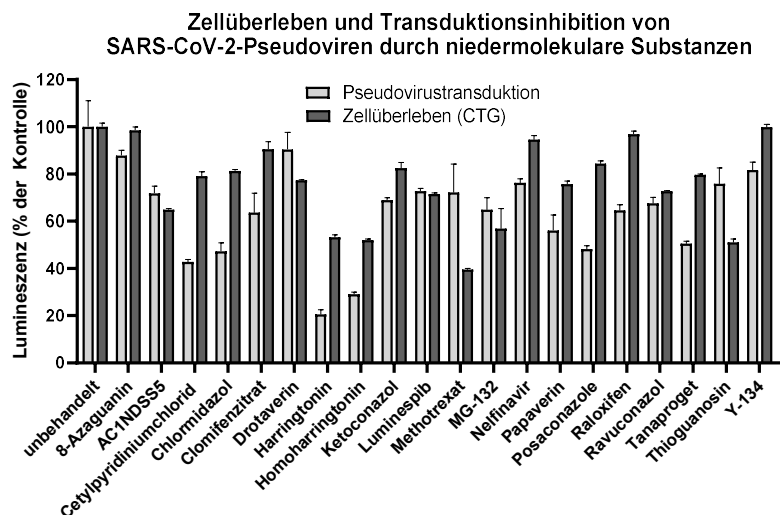


Abbildung 25: Inhibitorische Wirkung von 20 niedermolekularen Substanzen gegen SARS-CoV-2-Pseudovirus sowie Signal des Zellüberlebens auf CaCo2-Zellen. Die Substanzen wurden in einer einzelnen Dosis von 10 μ M verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels luminometrischer Messung, im Fall der Pseudovirus-Transduktion wurde das Luciferasesignal gemessen, für das Zellüberleben wurde den behandelten Zellen CellTiter-Glo hinzugegeben und das Signal gemessen. Die Werte sind in % des Signals der Kontrolle ohne Testsubstanzen angegeben.

Wie in Abbildung 25 zu sehen, zeigten die Substanzen sehr unterschiedliche Wirkungen sowohl auf die Pseudovirus-Transduktion als auch auf das mittels CellTiter-Glo (CTG) gemessene Zellüberleben. Die meisten Substanzen führten zu einer moderaten Hemmung der Transduktion und einer messbaren, aber prozentual geringeren Hemmung des Zellüberlebens. Einige der Substanzen, wie Homoharringtonin und Harringtonin, bewirkten zwar eine deutliche Verringerung des als Transduktionsmarker genutzten Luciferasesignals, resultierten allerdings in einem ebenso starken Toxizitätssignal. Ebenfalls auffällig waren die Wirkung von Methotrexat und Thioguanosin, bei denen die Hemmung des CTG-Signals deutlich stärker ausfiel, als die des Luciferasesignals. Für die weiteren Versuche wurden 8 Substanzen durch den Kooperationspartner (Fraunhofer IME) ausgewählt. Darunter waren mit Ketoconazol, Chlormidazol, Raloxifen, Posaconazol, Cetylpyridiniumchlorid und Nelfinavir solche Substanzen, die eine Toxizität von weniger als 20% und eine im Vergleich stärkere Inhibition des Luciferasesignals hatten. Zusätzlich wurden Methotrexat (starke Hemmung des CTG-Signals, geringere Hemmung des Luc-Signals) und Luminespib (geringe Hemmung beider Signale) für ein weiteres Experiment ausgewählt.

5.2.4.3. Spezifische Wirkung und Toxizität von 8 Substanzen

Die aus dem vorherigen Experiment ausgewählten Substanzen wurden in einem weiteren Schritt einer detaillierteren Analyse unterzogen. Hierzu wurden drei parallele Assays mit einem SARS-CoV-2-D614G-Pseudovirus, einem VSV-Pseudovirus und mit CellTiter-Glo angesetzt, in denen die Substanzen jeweils in einer Verdünnungsreihe eingesetzt wurden. Hierdurch sollte die Dosisabhängigkeit der Wirkung auf Pseudovirus-Transduktion und Zellüberleben untersucht werden, durch den Vergleich mit dem VSV-Pseudovirus aber auch eine unspezifische Wirkung auf den Pseudovirusassay selbst ausgeschlossen werden.

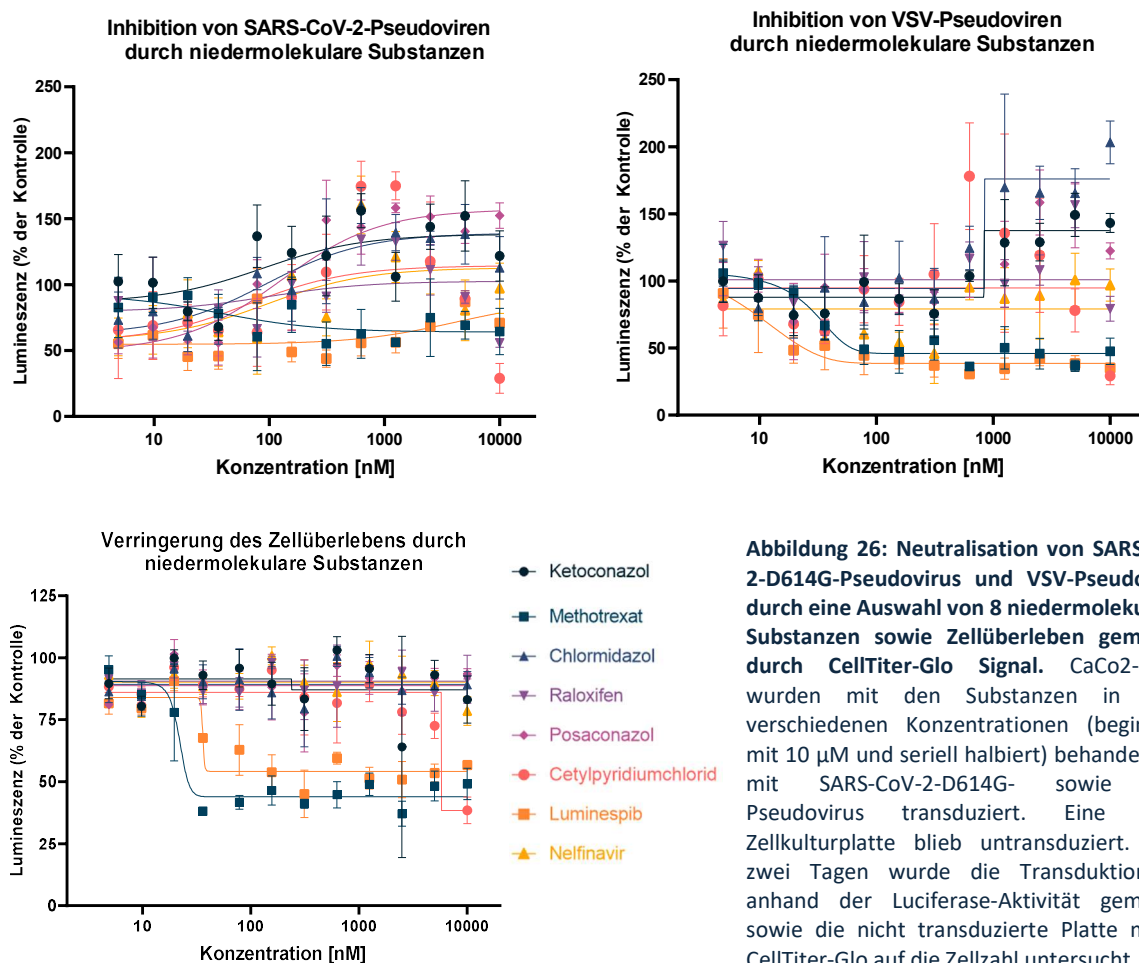


Abbildung 26: Neutralisation von SARS-CoV-2-D614G-Pseudovirus und VSV-Pseudoviren durch eine Auswahl von 8 niedermolekularen Substanzen sowie Zellüberleben gemessen durch CellTiter-Glo Signal. CaCo2-Zellen wurden mit den Substanzen in zwölf verschiedenen Konzentrationen (beginnend mit 10 μ M und seriell halbiert) behandelt und mit SARS-CoV-2-D614G- sowie VSV-Pseudovirus transduziert. Eine dritte Zellkulturplatte blieb untransduziert. Nach zwei Tagen wurde die Transduktionsrate anhand der Luciferase-Aktivität gemessen sowie die nicht transduzierte Platte mittels CellTiter-Glo auf die Zellzahl untersucht.

Wie in Abbildung 26 zu sehen, wurde im gemessenen Konzentrationsbereich für keine der Substanzen eine 50%ige inhibitorische Wirkung gegen SARS-CoV-2 erreicht und lässt sich auch kein deutlich inhibitorischer Trend im Verlauf einer Dosis-Wirkungskurve erkennen. Raloxifen zeigt im Konzentrationsbereich $> 1 \mu$ M eine deutliche Senkung des Signals im SARS-CoV-2-Assay, diese erreicht jedoch weder eine 50%ige Hemmung noch ergibt sich eine Dosis-Wirkungs-Kurve, aus der sich eine IC₅₀ errechnen lässt. Auf das Transduktionssignal der VSV-

Pseudoviren hatten Methotrexat und Luminespib eine hemmende Wirkung, während unter Behandlung mit Chlormidazol, Cetylpyridiumchlorid und Ketoconazol ein Anstieg des Transduktionssignals festzustellen war. Die Analyse des Zellüberlebens mittels CellTiter-Glo ergab eine starken Verringerung des Signals unter Behandlung mit bereits geringen Dosen von Luminespib und Methotrexat. Cetylpyridiumchlorid zeigte in der höchsten verwendeten Dosis eine Hemmung des CTG-Signals von über 50%.

5.2.4.4. Raloxifen inhibiert SARS-CoV-2-Pseudoviren in vitro

Aufgrund der besten Inhibition in den vorherigen Versuchen sowie eigenen Ergebnissen der Kooperationspartner (Fraunhofer IME) wurde die Aktivität von Raloxifen weiter untersucht. Hierzu wurden zunächst HEK293T-ACE2 mit beiden Reportersystemen (eGFP und Luciferase) im Assay verwendet. So kann sichergestellt werden, dass keine der Substanzen z.B. ein Luciferase-Inhibitor ist und zu falsch-positiven Ergebnissen führt. Im Versuch mit Luciferase wurde zudem die Konzentrationsspanne um den Faktor 3 erhöht, um eine vollständige, die maximal erreichbare Inhibition einschließende Dosis-Wirkungskurve zu erhalten.

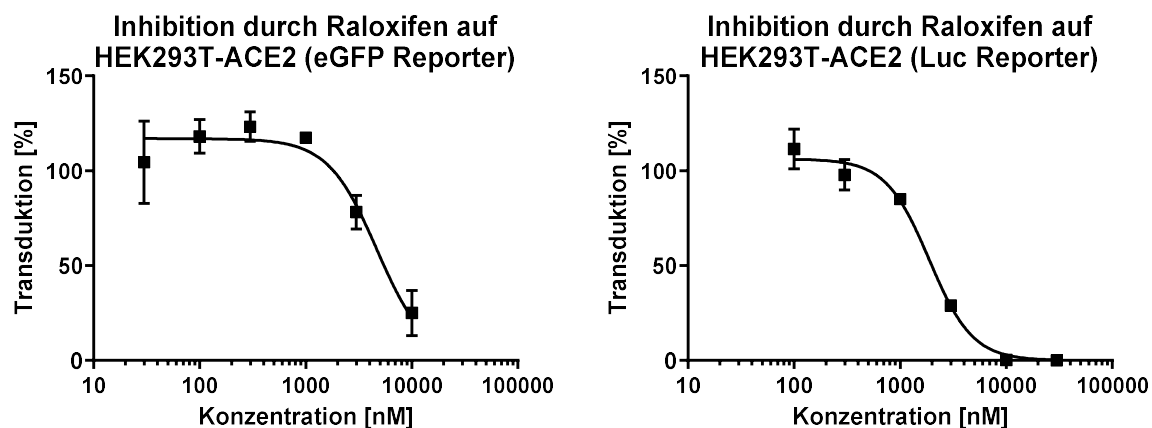


Abbildung 27: Messung der Inhibition von SARS-CoV-2-D614G-Pseudovirus durch Raloxifen auf HEK293T-ACE2-Zellen, gemessen mit zwei verschiedenen Reportersystemen. HEK293T-ACE2-Zellen wurden mit Raloxifen in sechs verschiedenen Konzentrationen behandelt und mit SARS-CoV-2-D614G-Pseudovirus transduziert, der einmal eGFP und einmal Luciferase als Reportergen exprimierte. Während für den Versuch mit eGFP-Reporter die Konzentrationen 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1.000 nM, 3.000 nM und 10.000 nM verwendet wurden und die Analyse im Durchflusszytometer erfolgte, wurde für die Messung mit Luciferase ein nochmals um den Faktor 3 höherer Konzentrationsbereich gewählt und das Signal luminometrisch bestimmt. Mit beiden Reportern ließen sich eindeutige Dosis-Wirkungs-Kurven ermitteln. Die IC₅₀ im Assay mit eGFP betrug 4689 nM, im Assay mit Luciferase 1881 nM. IC₅₀: Für eine 50%ige Inhibition notwendige Konzentration.

Beide Reportersysteme ergaben eindeutige Dosis-Wirkungskurven für Raloxifen. Die gemessene IC₅₀ betrug für den Luciferase-Assay 1881 nM und für den eGFP-Assay 4689 nM.

5.2.4.5. Inhibition durch Raloxifen ist SARS-Envelope-spezifisch

Um eine vom SARS-CoV-2-Envelope unabhängige Wirkung von Raloxifen auszuschließen, wurde parallel zum SARS-CoV-2-Pseudovirus auch ein VSV-Pseudovirus sowohl mit dem anti-SARS-CoV-2-Nanobody VHH-72 als auch mit 5 μ M Raloxifen behandelt und die Transduktionsrate mittels Lumineszenz gemessen. Wie in Abbildung 28 gezeigt, verringerte die Behandlung mit dem Nanobody VHH-72 wie auch die Behandlung mit 5 μ M Raloxifen die Transduktionsrate des SARS-CoV-2-Pseudovirus hoch signifikant ($p < 0,001$, Holm-Sidak), während die Transduktionsrate des VSV-Pseudovirus nicht signifikant verringert wurde ($p = 0,48$ und $p = 0,11$).

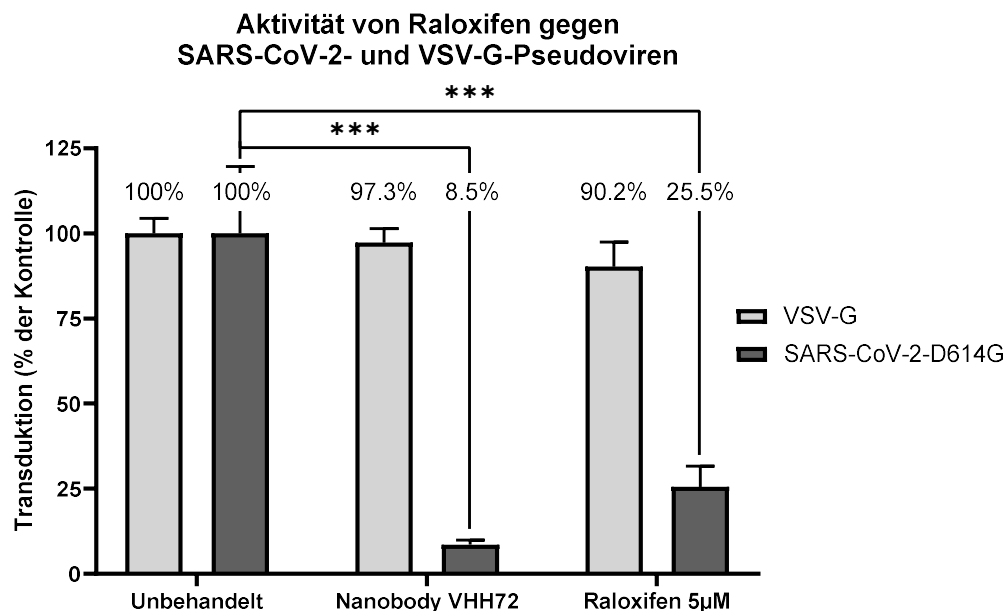


Abbildung 28: Vergleich der Wirkung von Raloxifen und des SARS-CoV-2 spezifischen Schwereketten-Antikörpers VHH-72 auf einen SARS-CoV-2-D614G-Pseudovirus und einen VSV-Pseudovirus. Während die Behandlung mit VHH-72 die Transduktionsrate des VSV-Pseudovirus nicht signifikant inhibierte, fiel die Transduktionsrate des SARS-CoV-2-Pseudovirus auf 8,5%. Auch bei der Behandlung mit 5 μ M Raloxifen verringerte sich die Transduktionsrate des VSV-Pseudovirus nur geringfügig auf 90,2%, während die Transduktionsrate des SARS-CoV-2-Pseudovirus auf 25,5% fiel.

5.2.4.6. Inhibition verschiedener Virusvarianten durch Raloxifen auf verschiedenen Zelltypen

Die auf HEK293T-ACE2-Zellen festgestellte, SARS-CoV-2 spezifische Inhibition durch Raloxifen wurde auf ihre Breite gegen verschiedenen Virusvarianten sowie ihre Abhängigkeit vom Zelltyp untersucht. Hierzu wurden die drei verschiedenen Zelltypen HEK293T-ACE2, CaCo2 und Calu3 sowie die D614G-, Delta- und Omikron/BA.1-Varianten der SARS-CoV-2-Pseudoviren getestet. Es wurden hierfür Pseudoviren mit eGFP als Reporter verwendet.

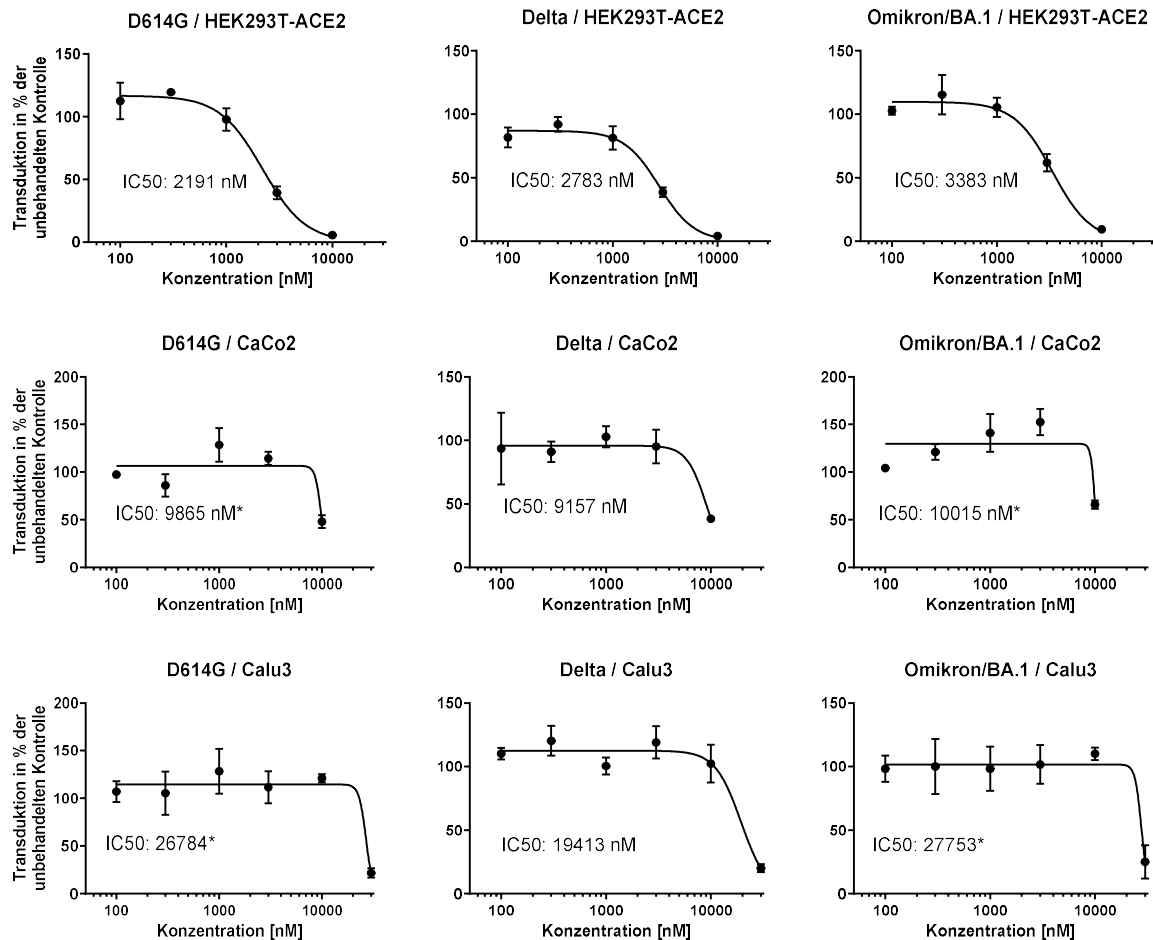


Abbildung 29: Neutralisation von SARS-CoV-2-Pseudovirus durch Raloxifen. HEK293T-ACE2-, CaCo2- und Calu3-Zellen wurden mit Raloxifen in den Konzentrationen 100 nM, 300 nM, 1 μ M, 3 μ M und 1 μ M behandelt. Calu3-Zellen wurden zusätzlich mit der Konzentration 30 μ M behandelt. SARS-CoV-2-Pseudoviren mit eGFP als Reportergen und den Spikeproteinen der Varianten D614G, Delta und Omikron/BA.1 wurden in diesem Assay verwendet. Die Inhibition auf HEK293T-ACE2-Zellen war am stärksten, die Inhibition auf Calu3-Zellen am schwächsten ausgeprägt. Auf HEK293T-ACE2-Zellen gab es geringe Unterschiede (23% bzw. 27%) zwischen den IC₅₀ Werten gegen die verschiedenen Pseudovirusvarianten, die Wirkung gegen die D614G Variante war am stärksten und gegen die Omikron/BA.1 Variante am schwächsten ausgeprägt. Mit * markierte Werte weisen darauf hin, dass PRISM8 die Dosis-Wirkungs-Kurve als „ambiguous fit“ deklariert, der Wert ist entsprechend ein Schätzwert des Programms. Daher können die Unterschiede in der Aktivität auf Calu3-Zellen nicht als eindeutiges Ergebnis behandelt werden. IC₅₀: Für eine 50%ige Inhibition notwendige Konzentration.

Die Inhibition der Transduktion war gegen alle Pseudovirusvarianten am stärksten auf HEK293T-ACE2-Zellen, deutlich schwächer auf CaCo2-Zellen und noch schwächer auf Calu3-Zellen. Die Unterschiede in der Inhibition der verschiedenen Pseudovirusvarianten waren weniger eindeutig, nur auf HEK293T-ACE2-Zellen war eine sinkende Inhibition vom D614G- zum Delta- und wiederum zum Omikron/BA.1-Pseudovirus zu erkennen. Die IC₅₀-Werte für D614G und Omikron/BA.1 auf Calu3-Zellen waren Schätzwerte auf Basis eines „ambiguous fit“ in PRISM8. Die Differenz von etwa 40% gegenüber der IC₅₀ gegen Delta basiert daher nicht auf eindeutigen Werten.

5.2.5. Neutralisierende Schwereketten-Antikörper gegen SARS-CoV-2

Der Assay wurde verwendet, um ein Panel von zehn neu generierten, rekombinanten Schwereketten-Antikörpern aus einem kürzlich etablierten LamaMice-Modell (Eden et al. 2024) auf ihre Eignung als hochspezifische, therapeutisch einsetzbare Moleküle gegen SARS-CoV-2 zu testen. Bei den Antikörpern handelte es sich um an die Kaninchen-IgG-Fc-Region (rbFc) gebundene Nanobodies (VHH). Aus Gründen der Lesbarkeit werden die Schwereketten-Antikörper nach dem verwendeten Nanobody benannt. In den Versuchen wurde nicht nur ihre Neutralisation von SARS-CoV-2-WT und damit der Spikevariante getestet, gegen deren Epitope sie im Mausmodell generiert wurden. Mit den Spikeproteinen von Omikron/BA.2 sowie Omikron/BA.5 wurden auch zwei zum Zeitpunkt der Untersuchung hochaktuelle Varianten mit großem Maß an Immunflucht untersucht. Somit konnten die mit den Nanobodies hergestellten Schwereketten-Antikörper auch darauf geprüft werden, ob sie konservierte Epitope binden und somit breit neutralisierende Eigenschaften besitzen. Zu guter Letzt diente der Assay auch der Validierung des zur Herstellung verwendeten LamaMice-Modells als geeignete Methode zur Generierung von neutralisierenden Schwereketten-Antikörpern gegen SARS-CoV-2.

5.2.5.1. Neutralisation von SARS-CoV-2-WT-Pseudovirus

Die Neutralisationsaktivität der Schwereketten-Antikörper wurde zunächst auf SARS-CoV-2-WT-Pseudoviren mittel Luciferase-Assay und CaCo2-Zellen gemessen. Als Kontrollen dienten verschiedene bereits etablierte oder durch andere Gruppen generierte Nanobodies (Nb12, Nb30, L-10E, VHH-72, Loew SB23).

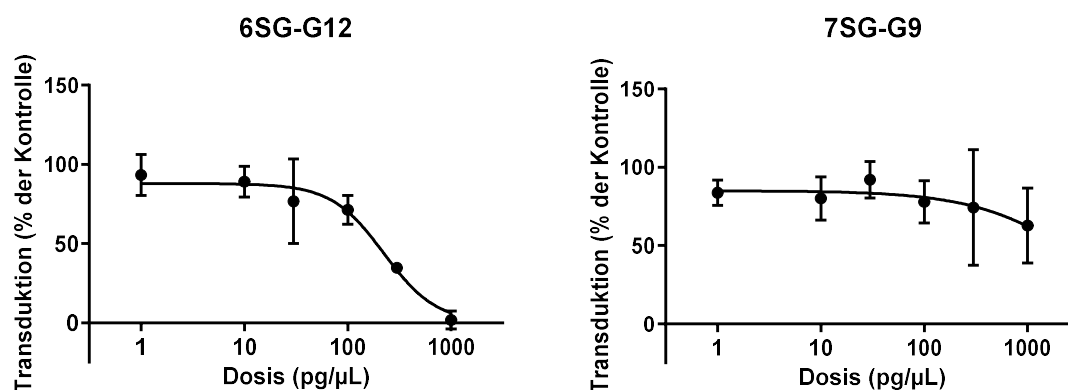


Abbildung 30: Neutralisation von SARS-CoV-2-WT-Pseudoviren durch die Schwereketten-Antikörper 6SG-G12 und 7SG-G9. 6SG-G12 als Nanobody mit der besten (IC₅₀: 223,6 nM) und 7SG-G9 als Nanobody mit der schlechtesten (IC₅₀: 3325 nM) Wirkung der neu generierten Nanobodies sind hier beispielhaft dargestellt. 7SG-G9 erreicht im gemessenen Dosisbereich bis 1 ng/μL keine 50%ige Neutralisation. IC₅₀: Für eine 50%ige Inhibition notwendige Konzentration.

Wie in Abbildung 30 für zwei der getesteten Schwereketten-Antikörper beispielhaft und in Abbildung 31 zusammenfassend für alle getesteten Schwereketten-Antikörper sowie die als Kontrollen genutzten Nanobodies dargestellt, zeigten sich unterschiedliche und zum Teil stark neutralisierende Aktivitäten gegen die SARS-CoV-2-WT-Pseudoviren. Die Neutralisation von 50% erreichten die Schwereketten-Antikörper teils deutlich unterhalb von 300 pg/μL. Die Dosis-Wirkungskurve von Nb12 ließ keine eindeutige Berechnung einer IC₅₀ zu. Die Schwereketten-Antikörper 7SG-G9, 6SG-F2 und 6SG-F5 sowie der Kontroll-Nanobody L-10E erreichten auch bei der maximal eingesetzten Konzentration von 1 nM keine 50%ige Hemmung der Pseudovirustransduktion, zeigten aber eine anhand der Dosis-Wirkungskurve berechenbare IC₅₀ auf. Daher wurden in den folgenden Versuchen höhere Konzentrationen eingesetzt, um auch diesen Bereich abzubilden.

IC₅₀ der Schwereketten-Antikörper gegen WT-Pseudovirus

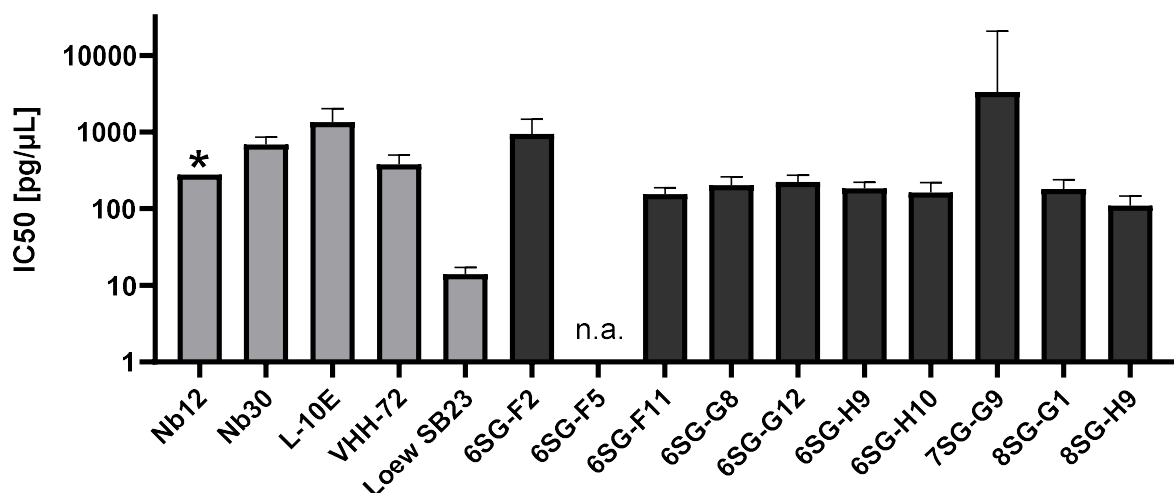


Abbildung 31: IC₅₀-Werte der Schwereketten-Antikörper und Nanobodies gegen SARS-CoV-2-WT-Pseudovirus. Die IC₅₀ Werte der neu entwickelten Schwereketten-Antikörper bewegten sich zwischen 110 pg/μL (8SG-H9) und 3325 pg/μL (7SG-G9), darunter ein Antikörper ohne berechenbaren IC₅₀-Wert (6SG-F5 / n.a.). Der Kontroll-Nanobody Loew SB23 vermittelte die mit Abstand stärkste Inhibition mit einer IC₅₀ von 13,9 pg/μL. *Für den Kontroll-Nanobody Nb12 ergab die berechnete IC₅₀ eine Standardabweichung, die nicht abbildbar ist (logIC₅₀ ~ 124,1). Dargestellt ist daher nur der mittlere berechnete IC₅₀ Wert. IC₅₀: Für eine 50%ige Inhibition notwendige Konzentration.

5.2.5.2. Neutralisation von Omikron/BA.2-Pseudovirus

Die Schwereketten-Antikörper wurden im nächsten Schritt parallel gegen SARS-CoV-2-WT-Pseudoviren und Omikron/BA.2-Pseudoviren getestet. Hierzu wurden HEK293T-ACE2 statt CaCo2-Zellen verwendet, um einen Einfluss der spezifischen Zelllinie auszuschließen.

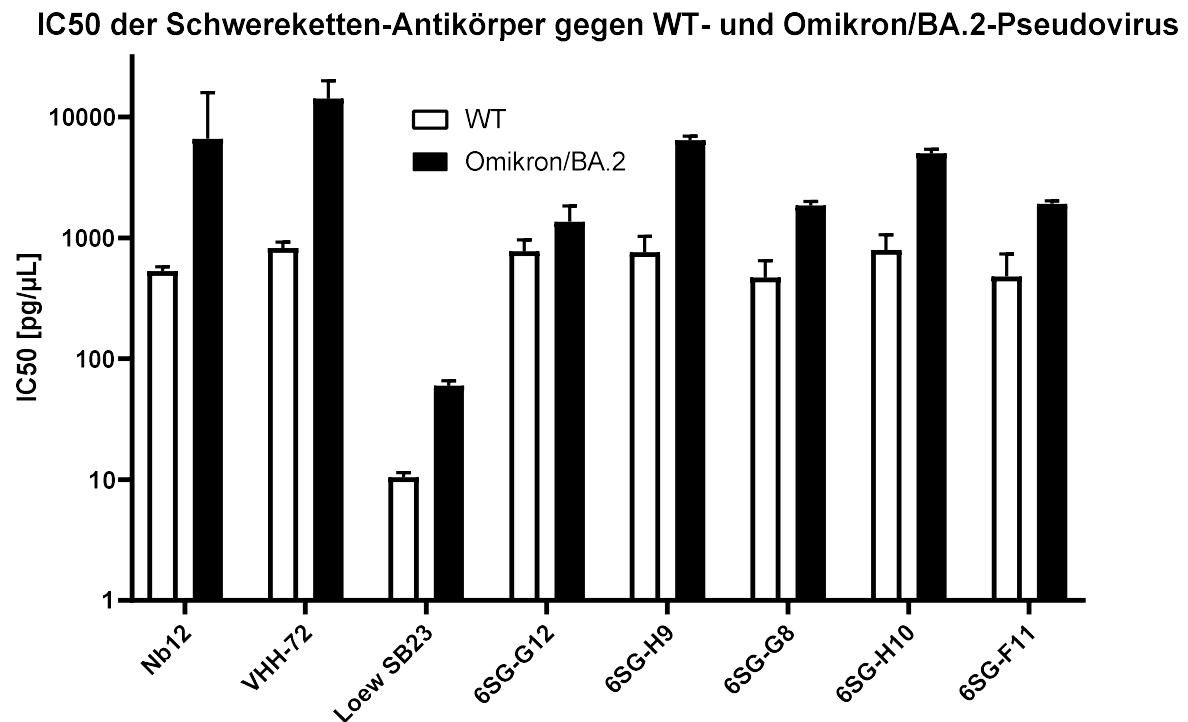


Abbildung 32: Neutralisation von SARS-CoV-2-Pseudovirus mit Wildtyp- und Omikron/BA.2-Spike durch Schwereketten-Antikörper und Kontroll-Nanobodies. Nb12, VHH-72 und Loew SB23 wurden als Positiv-Kontrollen genutzt. Dargestellt sind nur die Nanobodies und Schwereketten-Antikörper mit messbarer Inhibition beider Pseudovirusvarianten, zum direkten Vergleich der IC50 Werte (siehe Tabelle 9). Als Fehlerbalken dargestellt sind die durch PRISM8 ausgegebenen Standardfehler. Die 95% Konfidenzintervalle der Werte für WT und Omikron/BA.2 Pseudovirus überschneiden sich nur für 6SG-G12. Mit dem Wechsel der verwendeten Zellen geht eine Steigerung der IC50 Werte einher, das Verhältnis der IC50-Werte zwischen den verschiedenen Antikörpern bleibt. IC50: Für eine 50%ige Inhibition notwendige Konzentration.

Die Schwereketten-Antikörper sowie die zum Vergleich eingesetzten Nanobodies zeigten bei der Anwendung im WT-Assay höhere IC50 Werte, als im Versuch auf CaCo2-Zellen zuvor (siehe auch Tabelle 9). Im Verhältnis der Wirkungen zueinander spiegelte dieser Versuch die vorherigen Ergebnisse jedoch. L-10E, 7SG-G9, 6SG-F2 und 6SG-F5 zeigten erneut die geringste Hemmung der WT-Pseudoviren. Durch die höheren eingesetzten Konzentrationen konnten ihre IC50 jedoch erreicht bzw. präziser rechnerisch approximiert werden. Im Versuch mit BA.2 war die Aktivität stark verringert, nur der Kontroll-Nanobody Loew SB23 und die drei neu entwickelten Schwereketten-Antikörper 6SG-G12, 6SG-G8 und 6SG-F11 erreichten eine Hemmung von 50% der BA.2-Pseudoviren im untersuchten Konzentrationsbereich. Für die Kontroll-Nanobodies Nb12 und VHH-72 sowie für 6SG-H9 und 6SG-H10 ließ sich eine IC50

oberhalb des tatsächlich eingesetzten Konzentrationsbereichs rechnerisch abschätzen. Für die Schwereketten-Antikörper und Nanobodies mit einer messbaren Aktivität auf beiden Pseudovirusvarianten ist in Tabelle 9 der Vergleich ihrer IC₅₀ Werte und der Faktor der Abschwächung von WT auf BA.2 dargestellt.

Tabelle 9: IC₅₀-Werte der Schwereketten-Antikörper und Nanobodies im Neutralisationsassay auf HEK293T-ACE2-Zellen gegen SARS-CoV-2-Pseudoviren in der Wildtyp- und Omikron/BA.2-Variante. Unterschiede in der Wirksamkeit zwischen den Spikevarianten sind als Faktor angegeben. Dargestellt sind alle Schwereketten-Antikörper und Nanobodies mit messbarer Inhibition beider Pseudovirusvarianten. Die IC₅₀-Werte in diesem Versuch mit HEK293T-ACE2-Zellen liegen deutlich höher als beim Versuchsansatz mit CaCo2-Zellen (vgl. Abb. 31) IC₅₀: Für eine 50%ige Inhibition notwendige Konzentration.

Nanobody	Nb12	VHH-72	Loew SB23	6SG-G12	6SG-H9	6SG-G8	6SG-H10	6SG-F11
IC ₅₀ (WT) [pg/μL]	533,1	822,6	10,41	774,7	760,7	471	796	480,1
IC ₅₀ (BA.2) [pg/μL]	6601	14199	59,7	1360	6446	1851	5008	1913
Faktor	12	17	5,7	1,8	8,5	3,9	6,3	4,0

Tabelle 10: IC₅₀-Werte der Schwereketten-Antikörper und Nanobodies im Neutralisationsassay auf HEK293T-ACE2-Zellen gegen SARS-CoV-2-WT-Pseudoviren. Die hier gezeigten Schwereketten-Antikörper und Nanobodies hatten keine messbare Aktivität gegen die Omikron/BA.2-Pseudoviren. Die IC₅₀-Werte in diesem Versuch mit HEK293T-ACE2-Zellen liegen deutlich höher als beim Versuchsansatz mit CaCo2-Zellen (vgl. Abb. 31) IC₅₀: Für eine 50%ige Inhibition notwendige Konzentration.

Nanobody	Nb30	L-10E	8SG-G1	7SG-G9	8SG-H9	6SG-F2	6SG-F5
IC ₅₀ (WT) [pg/μL]	739,9	-	203,1	7458	120,0	10173	-

5.2.5.3. Keine Neutralisation von Omikron/BA.5-Pseudovirus

Fünf der zuvor verwendeten Schwereketten-Antikörper wurden zudem für eine vergleichende Testung der Neutralisation des SARS-CoV-2-WT-Pseudovirus und der Subvariante Omikron/BA.5 mittels Luciferase-basiertem Assay ausgewählt. Hierzu wurden die Schwereketten-Antikörper verwendet, die die Nanobodies 6SG-G12, 6SG-H9 oder 6SG-F11 (Mitglieder der Klonfamilie 2 (Eden et al., 2024)) enthalten, und nicht nur eine besonders hohe Aktivität gegen SARS-CoV-2-WT-Pseudoviren aufwiesen, sondern auch aktiv gegen BA.2-Pseudoviren waren. Um aus allen drei SARS-CoV-2-Spike-spezifischen Klonfamilien, die aus den LamaMice isoliert wurden (Eden et al., 2024), mindestens ein Mitglied zu analysieren, wurden zudem Schwereketten-Antikörper verwendet, die die Nanobodies 7SG-G9 (Mitglied der Klonfamilie 3 (Eden et al., 2024)) oder 8SG-G1 (Mitglied der Klonfamilie 1 (Eden et al., 2024)) enthalten und gegen BA.2-Pseudoviren unwirksam waren. Als Kontrollen dienten erneut die Nanobodies Nb12, Nb30 und VHH-72.

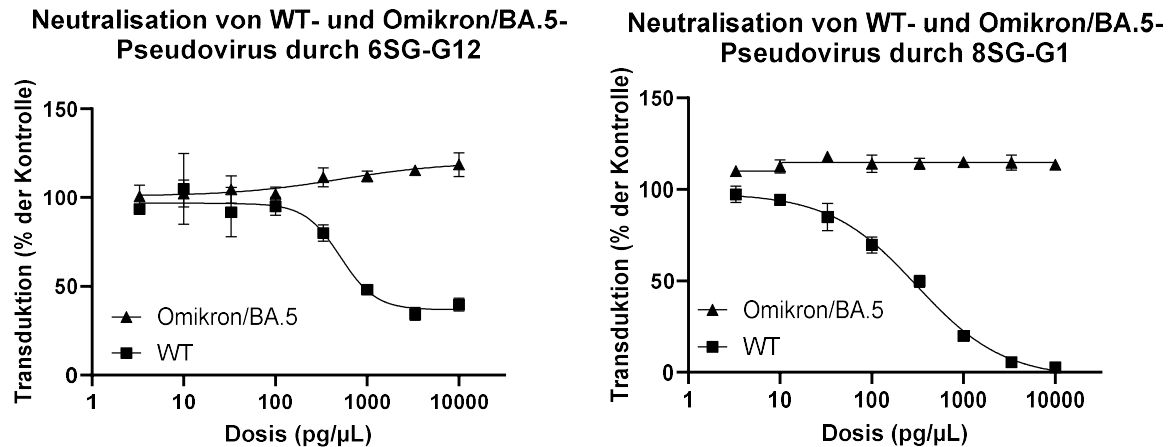


Abbildung 33: Neutralisation von SARS-CoV-2-WT- und Omikron/BA.5-Pseudoviren durch die Schwereketten-Antikörper 6SG-G12 und 8SG-G1 auf HEK293T-ACE2-Zellen. Keiner der fünf verwendeten Schwereketten-Antikörper hatte eine messbare neutralisierende Wirkung gegenüber dem Omikron/BA.5-Pseudovirus. Dargestellt sind beispielhaft der Nanobody mit der höchsten Aktivität gegenüber dem Omikron/BA.2-Pseudovirus und dem geringsten Aktivitätsverlust gegenüber dem Wildtyp-Pseudovirus (6SG-G12) sowie der Nanobody mit der höchsten Aktivität auf dem Wildtyp-Pseudovirus (8SG-G1).

Keiner der getesteten Schwereketten-Antikörper und Nanobodies hatte eine messbare Neutralisationsaktivität gegenüber den BA.5-Pseudoviren, wie am Beispiel von 6SG-G12 und 8SG-G1 in Abbildung 33 dargestellt. Somit war weder der Schwereketten-Antikörper mit der höchsten Aktivität gegen die Wildtyp-Pseudoviren noch der Schwereketten-Antikörper mit der höchsten Aktivität gegen die BA.2-Pseudoviren wirksam gegen BA.5-Pseudoviren.

Tabelle 11: IC50-Werte der Schwereketten-Antikörper und Nanobodies im Neutralisationsassay auf HEK293T-ACE2-Zellen gegen SARS-CoV-2-WT- und Omikron/BA.5-Pseudoviren. Keiner der Schwereketten-Antikörper und Nanobodies hatte eine messbare Aktivität gegen die Omikron/BA.5-Pseudoviren. IC50: Für eine 50%ige Inhibition notwendige Konzentration.

Nanobody	Nb12	Nb30	VHH-72	6SG-G12	6SG-H9	6SG-F11	7SG-G9	8SG-G1
IC50(WT) [pg/μL]	559,1	478,1	1147	774,7	484,9	587,5	5261	309,1
IC50(BA.5) [pg/μL]	-	-	-	-	-	-	-	-

6. Diskussion: Adaptive und sensitive lentivirale Vektorassays

Die in dieser Arbeit vorgestellten Versuche zeigen auf, welche Bandbreite an virologischen Assays sich mithilfe lentiviraler Vektoren entwickeln lässt und welche verschiedenen Fragestellungen sich damit ergründen lassen. Dabei werden eine Vielzahl der Vorteile von lentiviralen Vektoren genutzt. Die Möglichkeit der vielfältigen Pseudotypisierung erlaubt sowohl die Verwendung unterschiedlicher Zielzellen als auch die "Simulation" verschiedener Viren (Joglekar und Sandoval 2017). Neben den in dieser Arbeit genutzten Envelopes der jeweils global hoch relevanten Viren HIV-1 und SARS-CoV-2 gibt es beispielsweise auch Forschung mit Zika-Pseudoviren auf Basis lentiviraler Vektoren (Kretschmer et al. 2020). Die Anpassungsfähigkeit des Assays geht über wechselnde Viren hinaus und erlaubt auch die Untersuchung verschiedener Subvarianten eines Virus. Dies wird in den Versuchen zu SARS-CoV-2 verdeutlicht und erweist sich als entscheidend. Es wird jedoch nicht nur die Oberfläche lentiviraler Vektoren betrachtet. Auch die von HIV-1 entlehene Virusbiologie kann für die Forschung verwendet werden, auch wenn hierbei das Virus offensichtlich vorgegeben ist. Wie bei der Pseudotypisierung mit verschiedenen Varianten von SARS-CoV-2 kann der Vektor auch bei der Erforschung von HIV-1 stark angepasst werden, hier anhand der in ihm enthaltenen HIV-1-Enzyme. Ob es um die Eingrenzung des Lebenszyklus zur Targetidentifikation geht oder um die Anpassung an Virusvarianten mit resistenten Enzymen, die Möglichkeiten gehen weit über die simple Feststellung der Aktivität einer Substanz gegen eine einzige Virusvariante hinaus.

6.1. Ein Panel hochaktiver Leadsubstanzen für HIV-1

6.1.1. Vorarbeiten, Auswahl der 5 vielversprechendsten Substanzen

In den Vorarbeiten (Woens 2018) konnte die Inhibition der lentiviralen Vektoren durch 17 Substanzen bestätigt und als Wirkung auf den Prozess der reversen Transkription des Virus identifiziert werden. Mithilfe neu entworfener, gegen verschiedene Klassen von HIV-1-Therapeutika resistenter Vektoren konnte die Identität der Substanzen als NNRTIs festgestellt werden. Einige der Substanzen zeigten eine deutliche Restaktivität gegen NNRTI-resistente Vektoren, auch wenn sie NNRTI-spezifischen Aktivitätsmustern folgten, also neben der verringerten Aktivität gegen den NNRTI-resistenten Vektor auch eine erhöhte Aktivität gegen den NRTI-resistenten Vektor aufwiesen (Wensing et al. 2016). Diese Substanzen waren die

interessantesten Kandidaten für eine sinnvolle Ergänzung des bestehenden Arsenal antiretroviraler Medikamente und wurden daher zur weiteren Analyse (Kapitel 5.1.2., Abbildung 16) ausgewählt.

6.1.2. Aktivität der 5 vielversprechendsten Substanzen und zugelassener Therapeutika gegen NNRTI-resistenten Vektor

Die Dosis-Wirkungs-Kurven der Substanzen 1, 3, 23, 28 und 31 auf dem NNRTI-resistenten Vektor zeigten Resistenzfaktoren von 4,4 bis 23,1, wobei die durchschnittliche Verschiebung eine Größenordnung betrug. Die Resistenz des Vektors gegen die vier zugelassenen NNRTI-Medikamente, die wir im Assay verwendet hatten, betrug mindestens Faktor 280 und im Durchschnitt eher drei Größenordnungen. Dieser Unterschied ist von hoher Bedeutung, da die Nebenwirkungen die maximal mögliche Dosierung bei der medizinischen Behandlung stark einschränken. Gerade für NNRTIs sind dosisabhängige hepatotoxische Effekte bekannt, die insbesondere in der Kombination mit anderen Risikofaktoren ein Problem für die Therapie darstellen können (Kontorinis und Dieterich 2003; Sulkowski et al. 2002). Ein Medikament, das trotz einer Resistenz gegen seine eigene Stoffklasse in einer sicheren Konzentration verwendet werden kann, weil es um Größenordnungen weniger anfällig gegen die bisher auftretenden Mutationen ist, wäre von großer praktischer Bedeutung für die Therapie. Daher sind Leadsubstanzen, die diese Nische füllen, besonders interessant. Zwar ist davon auszugehen, dass sich auch für ein solches Medikament spezifische Resistenzmutationen bilden, sobald es in der Praxis eingesetzt wird und den entsprechenden Selektionsdruck ausübt. Jedoch dauert dieser Prozess und die Möglichkeiten des Virus zur Mutation unter Aufrechterhaltung seiner Fitness sind begrenzt, zumal unter effizienter Inhibition der Replikation.

6.1.3. ADME/PK Analyse der 5 vielversprechendsten Substanzen

In der ADME/PK Analyse ergab sich eine Löslichkeit aller Substanzen oberhalb von 10 μM , was als Cutoff für Leadsubstanzen gilt, unterhalb derer die Löslichkeit eine große Herausforderung im Entwicklungsprozess darstellen kann. Die von den Substanzen 3, 23 und 28 erreichte Löslichkeit von >50 μM lag deutlich über diesem Wert, was eine gute Voraussetzung für die Entwicklung als Leadsubstanzen darstellt (Lipinski 2000; Stegemann et al. 2007).

Für die Halbwertszeit von Leadsubstanzen wird in der PK ein Wert von 30 min angestrebt, während 60 min als Wert für ein besonders günstiges Stabilitätsprofil gilt (Hughes et al. 2011; Słoczyńska et al. 2019). Substanz 23 kam mit 22,3 Minuten in die Nähe der Zielmarke, während Substanz 31 mit 41,5 Minuten zumindest oberhalb des ersten Grenzwertes lag (siehe Tabelle 7). Eine hohe Halbwertszeit ist für konstant eingenommene Medikamente wie HIV-1 Therapeutika von hoher Bedeutung, da die dauerhafte Inhibition des Virus notwendig und die Compliance der Patienten eine konstante Herausforderung ist. Leadsubstanzen können jedoch durch chemische Modifikation in ihrer Stabilität deutlich verbessert werden, beispielsweise indem Randgruppen hinzugefügt oder entfernt werden, die für die Interaktion mit dem Target nicht zentral sind (Nassar et al. 2004; Meanwell 2018). Die Beurteilung der Möglichkeiten bei diesen spezifischen Molekülen wäre die Aufgabe der entsprechenden Experten in einem weiteren Entwicklungsprozess und verlässt den Bereich dieser Arbeit.

Zur Entfaltung der pharmakologischen Wirkung sollte ein Wirkstoff eine (Plasmaprotein-) ungebundene Fraktion von 10-20% aufweisen, da eine sehr starke Bindung die Verteilung im Gewebe und das Erreichen der Zielzellen erschwert. Mit 17% ungebundener Fraktion erreicht Substanz 23 als einzige diesen Wert, was einen Hinweis auf eine günstigere Verteilungsdynamik im Körper darstellt, was die notwendige Dosis als Medikament verringern kann. Gerade im Vergleich zu anderen NNRTIs wie beispielsweise Efavirenz, welches zu über 99% in gebundener Form vorliegt, ist dieser Wert sehr hoch und günstig (Boffito et al. 2003).

6.1.4. Toxizität der 5 vielversprechendsten Substanzen und zugelassener Therapeutika

Der Toxizitätsassay zeigte, dass die ausgewählten fünf Substanzen neben ihrer bereits dargestellten Wirkung gegen WT und NNRTI-resistente Vektoren auch eine geringe in-vitro Toxizität aufweisen. Unter den getesteten Substanzen hemmte Substanz 1 das Zellwachstum am stärksten, mit einer 50%igen Hemmung bei 12,1 μM bzw. 13,1 μM nach 3 bzw. 6 Tagen. Während Substanz 28 selbst bei 30 μM keine 50%ige Hemmung erreichte, zeigte Substanz 23 überhaupt keine messbare Hemmung des Zellwachstums. Dies steht im starken Kontrast zu Efavirenz und Dolutegravir, zwei für die langfristige Therapie von HIV-1 Patienten zugelassenen Medikamenten. Efavirenz zeigte bereits bei 2,7 μM bzw. 3,1 μM eine 50%ige Reduktion der Zellzahl. Dolutegravir wies nach 3 Tagen noch keine zytostatische Wirkung auf, erreichte jedoch nach 6 Tagen bereits bei 7,6 μM eine 50%ige Hemmung der Proliferation.

Während die Ergebnisse eines in-vitro Toxizitätsassays keine weitreichenden Aussagen über das Sicherheitsprofil einer Substanz zulassen, ist die deutlich (gegenüber Efavirenz um eine Größenordnung) geringere Toxizität ein positives Signal für die weitere Entwicklung und zeigt, dass die bei sehr hohen Dosen gemessene Reduktion der Zellzahl kein Ausschlusskriterium für die Substanzen darstellt (Saeidnia et al. 2015; Loiodice et al. 2019).

6.1.5. Substanz 23 als vielversprechendster Kandidat

Aufgrund der hier gezeigten Versuche lässt sich zusammenfassend sagen, dass Substanz 23 der vielversprechendste Kandidat für die Weiterentwicklung als Leadsubstanz gegen HIV-1 ist. Mit einer IC₅₀ von 2.3 µM auf dem Wildtyp-Vektor hatte C23 zwar nicht die höchste Aktivität, jedoch war die durch den NNRTI-resistenten Vektor reduzierte Aktivität von 10 µM nur um einen Faktor von 4,4 geringer. Damit hatte C23 eine höhere Aktivität als das zugelassene Medikament Nevirapin (IC₅₀ von 93 µM auf dem NNRTI-resistenten Vektor). Da es sich um eine nicht chemisch optimierte Leadsubstanz handelt, ist dieser Vorsprung gegenüber einem bereits fertig optimierten Medikament besonders vielversprechend. Substanz 23 hat eine hohe Wasserlöslichkeit von etwa 65 µM und unter den 5 ausgewählten Substanzen auch als einzige eine ungebundene Fraktion im Plasmaprotein-Bindungs-Assay, die im angestrebten Bereich von 10-20% liegt. Die Halbwertszeit liegt nicht im gewünschten Bereich von >30 min, sondern mit 22,3 Minuten etwas darunter. Dies wäre in der weiteren Entwicklung zu beachten, könnte aber bei Bedarf vermutlich durch chemische Modifikation von Randgruppen des Moleküls noch verbessert werden (Nassar et al. 2004; Meanwell 2018). Mit Raltegravir gibt es zudem bereits ein Beispiel für ein HIV-1-Therapeutikum, das trotz geringer metabolischer Stabilität weiterentwickelt und erfolgreich angewandt wurde (Iwamoto et al. 2008). Bei ausreichend hoher Attraktivität der restlichen Eigenschaften kann die geringe Halbwertszeit eines Wirkstoffes auch beispielsweise durch frequente Einnahme oder angepasste pharmazeutische Formulierung ausgeglichen werden.

6.2. SARS-CoV-2-Pseudovirusassay

Die im zweiten Teil der Arbeit gezeigten Versuche zeigen die erfolgreiche Etablierung, Optimierung und Anwendung eines SARS-CoV-2-Pseudovirusassays auf Basis lentiviraler Vektoren. Es konnte eine Kombination aus einem transduktionsoptimierten Pseudovirus und einer hoch permissiblen Zelllinie hergestellt werden, die Analysen mit zuverlässig hoher Signalstärke erlaubt. Diese Analysen erstrecken sich vom Nachweis neutralisierender Antikörper im Verlauf eines Impfprotokolls über die Untersuchung vielversprechender niedermolekularer Therapeutika im Drug-Repurposing Verfahren bis hin zur Testung neu generierter therapeutischer Antikörper. Sie erlauben eine schnelle und zuverlässige Anpassung der Versuchsparmeter an die Anforderungen einer dynamischen pandemischen Situation, wobei die fortlaufende Mutation des Virus und damit seine sich stetig verändernde Interaktion mit inhibitorischen Molekülen besonders hervorzuheben ist.

6.2.1. Herstellung von lentiviralen SARS-CoV-2-Pseudoviren

Die verschiedenen SARS-CoV-2-Spikeproteine konnten erfolgreich in zuverlässig transduzierende lentivirale Vektoren eingebaut werden. Hierbei erwies sich vor allem die Deletion von 18-19 C-terminalen Aminosäuren (d18/d19) als entscheidende Modifikation des Proteins, durch die eine Steigerung des Titters um den Faktor 500 erreicht werden konnte. Die Optimierung von Pseudoviren der SARS-Familie durch eine Deletion im c-Terminus des Spikeproteins ist ein bereits von SARS-CoV-1 bekannter Schritt (Giroglou et al. 2004; Lontok et al. 2004). Seine Wirkung basiert nach aktuellem Forschungsstand vermutlich auf dem in diesen 19 Aminosäuren enthaltenen endoplasmatischen Retentionssignal, dass die Entstehung der Viruspartikel in den produzierenden HEK293T-Zellen behindert (Johnson et al. 2020). Der Mechanismus konnte in den hier gezeigten Versuchen nicht nachvollzogen werden, die erwartete Steigerung des Transduktionstiters wurde jedoch eindeutig erreicht. Durch Einbringung der jeweiligen Mutationen in das Spike-Plasmid konnte der Assay binnen kurzer Zeit an neu auftretende VOCs von SARS-CoV-2 angepasst werden, was gegenüber der Modifikation des vollständigen Virusgenoms eine enorme Aufwandsersparnis darstellt. Mit den hergestellten Pseudoviren konnten alle ausgewählten Varianten von SARS-CoV-2 (in dieser Arbeit: Wildtyp, D614G, Delta, Omikron/BA.1, Omikron/BA.2, Omikron/BA.5) nachgestellt werden und somit konstant eine Anwendbarkeit des Assays auf die jeweils aktuellen Herausforderungen der Pandemie sichergestellt werden.

6.2.2. Herstellung von stark ACE2-exprimierenden HEK293T-Zellen

Auf Seite der Zellen im Pseudovirusassay ist insbesondere der ACE2-Rezeptor von Interesse, den SARS-CoV-2 und entsprechend auch der mit dem SARS-CoV-2-Spike pseudotypisierte Vektor nutzt, um an die Zelle zu binden und sie zu infizieren/transduzieren. Die Transduktion zur Überexpression des Rezeptorproteins sowie die anschließende Selektion mittels Puromycin, PE-Färbung und Zellsortierung/FACS führten zu einem besonders permissiven Klon (Klon 2G7), der ein deutlich stärkeres Signal erzeugte und dadurch die Auslesung des Assays erleichterte.

6.2.3. Neutralisation von SARS-CoV-2-Pseudovirus durch Serum

Die Untersuchung von Serumproben auf ihre (antikörpervermittelte) Neutralisation des SARS-CoV-2-Pseudovirus bietet gerade im Hinblick auf den langfristigen Schutz vor Infektion und schwerem Krankheitsverlauf einen entscheidenden Vorteil gegenüber den üblicherweise zur Detektion von Antikörpern durchgeführten Immunoassays (Horn et al. 2022). Diese lassen durch die reine Quantifizierung bindender Antikörper keine zuverlässigen Schlüsse über die neutralisierende Wirkung der Antikörper gegen das Virus zu. Zum effektiven Infektionsschutz müssen diese nicht nur eine hochaffine, sondern auch spezifische Bindung derjenigen Epitope des Virus leisten, die für Rezeptorbindung und Zelleintritt entscheidend sind. Insbesondere können rein quantitative Tests nicht den Prozess der Affinitätsreifung abbilden, welche entscheidend für die Fähigkeit des Immunsystems ist, langfristig auch mit einer geringen Anzahl von Antikörpern und damit auch mit geringeren metabolischen Kosten einen effektiven Schutz aufrecht zu erhalten. Die Messung der Neutralisation in unserem Assay stellt dagegen den konkreten biologischen Prozess nach, der klinisch und epidemiologisch von Interesse ist.

6.2.3.1. Neutralisation im Verlauf des Impfprotokolls

In der Abbildung 22 kann die hier beispielhaft gemessene Verlaufskurve der Neutralisationsaktivität von Serum gegen SARS-CoV-2 nachempfunden werden, die sowohl von der Anzahl der erfolgten Impfungen als auch vom Nachlassen der Antikörperantwort im Lauf der Zeit abhängt. Die Veränderung des Neutralisationstiters deckt sich mit den Erwartungen aus der Literatur sowohl zu SARS-CoV-2 als auch zu anderen Viren und der Immunreaktion auf diese, bzw. auf gegen sie entwickelte Schutzimpfungen (Zhao et al. 2023;

Hill et al. 2021). Nach einem moderaten Anstieg der Neutralisationsaktivität nach einem einzelnen Kontakt folgt ein starker Anstieg bei erneuter Impfung, da das Immunsystem auf den wiederholten Antigenkontakt stärker und durch die bereits erfolgten Anpassungen der ersten Impfung auch schneller reagiert. Sogar der Prozess der Affinitätsreifung lässt sich anhand der gezeigten Daten erahnen. Dass der Kurvenverlauf der Probe 6 Monate nach der dritten Impfdosis deutlich steiler ist, könnte auf die deutlich gesteigerte Neutralisationsaktivität einzelner Antikörper hinweisen, die nach erfolgter Reifung zugunsten höherer Bindungsaffinität zu erwarten ist (Moriyama et al. 2021). Bei einer Verdünnung von 1:10 ist entsprechend in der Probe 6 Monate nach Zweitimpfung dieselbe vollständige Neutralisation zu sehen, wie für Proben wenige Wochen nach der Zweitimpfung, für die von einer deutlich höheren Anzahl von Antikörpern auszugehen ist.

Auch der Vergleich mit einem anderen Assay, der auf dieselben Proben angewendet wurde, bestätigt die zuverlässige Natur des hier entwickelten Pseudovirus-Assays. Zur Demonstration sind in Abbildung 34 vergleichend die Ergebnisse des SARS-CoV-2-Pseudovirusassays (links) und eines Lebendvirus-Assays dargestellt, der zur Untersuchung der Proben im Rahmen eines Impfstoffentwicklungsprojektes angestellt wurde (Mayer et al. 2024).

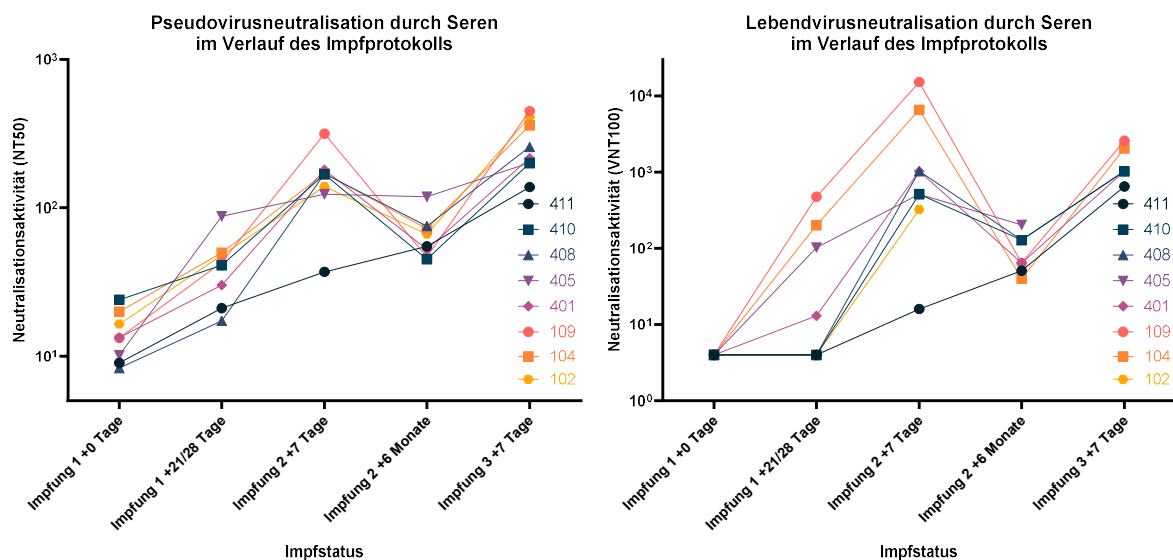


Abbildung 34: Neutralisation durch Seren im Verlauf des Impfprotokolls, Vergleich zwischen Pseudovirusassay und Lebendvirusassay. Für den Lebendvirusassay waren nicht für alle Proben Daten verfügbar. Für Person 104 und 401 lagen die vierten Messpunkte jeweils 77 und 34 Tage später, also etwa 8 und 7 Monate nach der zweiten Impfung. Die Verläufe der Neutralisationsaktivität ähneln sich stark. Allerdings zeigt der Pseudovirusassay eine hohe Sensitivität für geringfügig hemmende Effekte. In ihm ist eine geringe Neutralisationsaktivität an Tag 0 festzustellen, bevor eine Wirkung der Impfung eintreten kann und die Hemmung auf unspezifische Faktoren zurückführbar machen würde. Das untere Detektionslimit des Lebendvirusassays lag bei einem Titer von 8, Werte darunter sind hier als 4 angegeben. Die erwartete spezifische Neutralisation 21/28 Tage nach der ersten Impfdosis zeigt der Pseudovirusassay in allen Proben an, während der Lebendvirusassay nur für die Hälfte der Proben eine Neutralisation zeigt.

Im Lebendvirusassay wurde die Neutralisation durch die Abwesenheit zytopathischer Effekte in Vero C1008 Zellen 4 Tage nach ihrer Infektion mit einer definierten Menge eines SARS-CoV-2-Isolats definiert. Der als VNT100 angegebene Titer ist der (aus Triplikaten gemittelte) Wert der jeweils höchsten Verdünnungsstufe, in der keine zytopathischen Effekte feststellbar waren. Er stellt also anders als der NT50 keinen Wert zur 50%igen, sondern zur 100%igen Neutralisation dar. Wie zu sehen ist, stimmen die Verläufe der gemessenen Werte sehr gut überein. Probe 109 zeigt in beiden Assays jeweils die stärkste Neutralisation sieben Tage nach der zweiten und dritten Impfung. Probe 405 weist in beiden Assays einen flachen Verlauf der Neutralisation ab dem zweiten Zeitpunkt. Auch in der Abweichung vom erwarteten Verlauf der Neutralisation zeigen sie dasselbe Muster an, wie in Probe 411, die 6 Monate nach der Zweitimpfung noch einen höheren Wert aufweist, als eine Woche nach der Impfung.

Ein Unterschied ist die Neutralisationsaktivität an den ersten beiden Zeitpunkten. Im Lebendvirusassay wurde am ersten Zeitpunkt keine Neutralisation gemessen, am zweiten, also 21/28 Tage nach der ersten Impfung, nur für die Hälfte der Proben. Dies kann je nach Anwendung ein Vor- und Nachteil sein. Einerseits zeigt die geringe Neutralisation vor der ersten Impfung, dass von der Impfung unabhängige Hemmfaktoren auf den Pseudovirusassay wirken und im niedrigen Neutralisationstiterbereich nicht von der spezifischen Neutralisation nach erfolgter Immunisierung unterschieden werden können. Dies kann ein Nachteil sein, wenn nur der Einfluss von z.B. Impfungen untersucht werden soll. Andererseits bildet die Messung dieser Hemmfaktoren tatsächliche Prozesse der Virusabwehr im Serum ab, ein noch sensitiverer Lebendvirusassay hätte also auch hier womöglich ein Signal gefunden. Vorteilhaft ist, dass im Pseudovirusassay konsistent die erwartbare Steigerung der Neutralisation bereits nach der ersten Impfung zu erkennen ist, während der Lebendvirusassay diese nicht immer abbildet. Die Sensitivität für geringe Anpassungen des Immunsystems nach einem einzelnen Antigenkontakt ist also im Pseudovirusassay höher.

Grundsätzlich sind Lebendvirusassays aufgrund ihrer Verwendung des tatsächlichen Virus der analytische Goldstandard (Sun et al. 2024). Aufgrund des großen Aufwands und der Sicherheitsbedingungen, die Experimente mit pathogenen Viren darstellen, sind hochwertige Pseudovirusassays jedoch eine wertvolle Alternative, die für SARS-CoV-2 eine wichtige Rolle spielt (Gao et al. 2025). Für den in dieser Arbeit vorgestellten Assay konnte die notwendige Zuverlässigkeit und Sensitivität demonstriert werden.

6.2.4. Inhibition der Transduktion durch therapeutische Substanzen

Mit der Untersuchung verschiedener Substanzen auf ihre Inhibition konnte auch jenseits der Impfstoff-relevanten klinischen Fragen ein Beitrag zur Bekämpfung der Pandemie geleistet werden. Nicht nur die vielversprechenden Daten, die für den Wirkstoff Raloxifen generiert wurden, sind dabei ein Erfolg. Zweck eines flexibel anwendbaren, schnell auslesbaren und materialintensiven Assays wie des hier dargestellten ist insbesondere, solche Substanzen auszusortieren, die nicht wirksam sind und bei einer Untersuchung mittels deutlich aufwendigerer Methoden sowohl Zeit als auch Kosten in einer ganz anderen Größenordnung verursachen würden. Besonders zu verweisen ist dabei auch auf die Vermeidung unnötiger Tierversuche gemäß dem 3R-Prinzip (Tannenbaum und Bennett 2015).

6.2.4.1. Inhibition durch neutralisierende Peptide

Bei der Testung potenziell neutralisierender Peptide der Arbeitsgruppe von Prof. Vincenzo Summa (Universität Neapel Federico II) und des Fraunhofer IME konnte eine Wirkung der Peptide MT1 und LM8 gegenüber SARS-CoV-2-Pseudoviren auf CaCo2-Zellen festgestellt werden, nicht jedoch auf HEK293T-ACE2-Zellen. Allerdings erreichte kein Peptid eine Neutralisation von $\geq 50\%$ im verwendeten Konzentrationsbereich. Der große Unterschied zwischen den beiden Zelltypen ist möglicherweise auf die Dichte der ACE2-Rezeptoren auf ihren Oberflächen zurückzuführen. Die Zelllinie CaCo2 ist eine etablierte humane Krebszelllinie, die hACE2 natürlich exprimiert. Die eigens für den Assay hergestellten HEK293T-ACE2-Zellen zeichnen sich durch besonders starke Expression des ACE2-Rezeptors aus. Hierdurch könnte ein unterschiedlich kompetitives Umfeld für die Bindung der neutralisierenden Substanzen entstehen. Während die Wirkung eines nicht besonders stark bindenden Inhibitors der Transduktion bei weniger permissiblen Zellen möglicherweise noch ins Gewicht fällt, könnte dieser seine Wirkung bei stärker permissiblen Zellen verlieren. Alternativ könnten die Zellen unterschiedlich geeignet für verschiedene Wege des Zelleintrittes sein. Da für SARS-CoV-2 zwei unterschiedliche Zelleintritt-Pathways existieren (Kuzikov et al. 2022), könnten die Peptide stärker auf einen der beiden einwirken und die unterschiedliche Wirkung dadurch zu erklären sein, dass dieser bei CaCo2-Zellen dominiert.

6.2.4.2. Testung niedermolekularer Inhibitoren von SARS-CoV-2

Aufgrund der effizienten Durchführbarkeit des optimierten Assays konnte ein breites Panel von im Hochdurchsatzverfahren entdeckten, niedermolekularen Substanzen mit vermutetem antiviralem Potenzial auf dieses getestet werden. Parallel konnte im selben Assay aufgrund seiner Zellkulturbasis auch direkt eine *in-vitro* Toxizitätsprüfung erfolgen, um bereits für die eher robuste Zellkultur toxische Substanzen von vornherein auszuschließen.

6.2.4.3. Spezifische Wirkung und Toxizität von 8 Substanzen

Nachdem die Testung mittels Einzeldosis eine Auswahl von vielversprechenden Testsubstanzen ergeben hatte, wurde ein detaillierterer Assay zur Bestimmung dosisabhängiger Effekte durchgeführt. Hierbei wurden parallel die Neutralisation von SARS-CoV-2-Pseudoviren und VSV-Pseudoviren untersucht, um einen unspezifisch inhibitorischen Effekt auszuschließen, als auch das Zellüberleben mittels CellTiter-Glo erneut überprüft. Anhand der Beispiele Methotrexat und Luminespib ist schnell ersichtlich, wie sinnvoll diese parallelen Untersuchungen sind. Beide Substanzen zeigten auch ein dosisabhängig verringertes Signal im VSV-Assay, waren also nicht SARS-CoV-2-spezifisch. Vor allem aber verringerten sie die Zellzahl bereits in geringer Dosis deutlich, hatten also einen ausgeprägten zytotoxischen Effekt. Letzteres erklärt vermutlich die verringerte Lumineszenz im VSV-Assay, die sich ohne diese Information als Inhibitionssignal lesen ließe.

6.2.4.4. Raloxifen neutralisiert SARS-CoV-2 in vitro

Mit Raloxifen konnte ein durch ein Hochdurchsatzscreening als vielversprechend identifiziertes, bereits zugelassenes Therapeutikum auf seine Wirkung gegen SARS-CoV-2-Pseudoviren untersucht werden. Zunächst ließ sich eine inhibitorische Wirkung bestätigen und hinsichtlich der notwendigen Konzentration einordnen. Die verschiedenen Reportersysteme (eGFP und Luciferase) zeigten dabei Aktivitäten in gleicher Größenordnung, jedoch mit einem Unterschied zugunsten der Aktivität im Luciferase-Assay. Eine Erklärung hierfür könnten Effekte von Raloxifen auf die Luciferaseexpression, den ATP-Spiegel oder die Zellproliferation sein, die den eGFP-basierten Assay nicht beeinflussen. Das binäre Auslesen von positiven/negativen Signalen im eGFP Assay hat hier einerseits Vorteile, da eine reduzierte Expression des Reportergens oder ein negativer Einfluss auf die Zellgesundheit nicht Teil des untersuchten Effektes der Virustransduktion ist. Andererseits kann das Auslesen

der Gesamthelligkeit der Population im Luciferase-Assay ebenfalls Vorteile haben, da sie beispielsweise die höhere Signalstärke mehrfach transduzierter und damit stärker exprimierender Zellen abbilden kann. Mehrfach transduzierte Zellen lassen sich im binär ausgelesenen eGFP-Assay nicht klar erkennen und auslesen. Jedoch lässt sich dieser Faktor durch eine korrekte Transduktionsrate und den damit einhergehenden geringer Anteil multipler Transduktionen reduzieren und wie in Kapitel 4.4. auch mathematisch korrigieren.

6.2.4.5. Neutralisation durch Raloxifen ist SARS-Envelope-spezifisch

Der Vergleich der Wirkung von Raloxifen gegen das SARS-CoV-2-Pseudovirus mit seiner Wirkung gegen ein VSV-Pseudovirus zeigt deutlich, dass die Aktivität von Raloxifen vom Envelope abhängt und keine allgemeine Hemmung der Transduktion des lentiviralen Vektors vorliegt. Dabei verhält sich Raloxifen etwa analog zu dem parallel eingesetzten SARS-CoV-2-Spike-spezifischen neutralisierenden Nanobody VHH-72, was die Spezifität zusätzlich unterstreicht. Der Mechanismus der Inhibition durch Raloxifen muss also in einer Wirkung auf die Spike-ACE2-Interaktion selbst oder auf nachgelagerte, ACE2-abhängige Prozesse wie proteolytisches Priming, Endozytose oder Membranfusion bestehen.

6.2.4.6. Inhibition von verschiedenen Virusvarianten durch Raloxifen auf verschiedenen Zelltypen

Mit der Nutzung verschiedener Varianten des Spikeproteins kann der Assay schnell auf das sich verändernde Virus angepasst werden. Die Relevanz dieser Anpassung konnte auch in Bezug auf die potenziell wirksame Substanz Raloxifen gezeigt werden. Die Ergebnisse unterstreichen zudem die Bedeutung der gewählten Zelllinie, da nur bei den spezifisch zu diesem Zweck hergestellten HEK293T-ACE2-Zellen ein klarer Unterschied zwischen den verschiedenen Virusvarianten zu erkennen war. Die Wirkung von Raloxifen war auf den CaCo2- und Calu3-Zellen deutlich weniger stark. Wie zuletzt in Kapitel 6.2.4.1. erwähnt, zeichnen sich die HEK293T-ACE2 Zellen durch eine besonders starke Expression des ACE2-Rezeptors aus. Bei einer kompetitiven Bindung von Raloxifen an Spikeprotein oder ACE2 wäre vom gegenteiligen Effekt auszugehen und eine schwächere Wirkung auf Zellen mit starker ACE2-Expression zu erwarten. Tatsächlich wurde auch in zu Raloxifen publizierten Studien keine direkte Inhibition der Spike-ACE2-Bindung festgestellt (Iaconis et al. 2022). Allerdings konnte darin gezeigt werden, dass das Spikeprotein eine Überexpression der

Metalloproteinase ADAM17 induzieren kann, die wiederum durch Raloxifen inhibiert wird. Der stärkere inhibitorische Effekt von Raloxifen auf die Transduktion von HEK293T-ACE2-Zellen ist somit mit der Hypothese vereinbar, dass eine erhöhte ACE2-Expression mit einer stärkeren Spike-vermittelten Aktivierung von ADAM17 einhergeht. Dadurch könnte die inhibitorische Wirkung von Raloxifen auf diesen Signalweg stärker zum Tragen kommen.

Da auf Calu3-Zellen nur IC50-Werte mit hoher Unsicherheit generiert wurden, ließ sich aus diesen kein klarer Unterschied in der Wirkung gegen die verschiedenen Spike-Varianten ableiten. Die Ergänzung der Messung um eine weitere, höhere Konzentration würde die Genauigkeit der Dosis-Wirkungskurve erhöhen und könnte diese Analyse erlauben. Bei einer Erhöhung der Konzentration auf 100 μM müsste allerdings auch ein möglicher toxischer Effekt überprüft werden, da dieser durch vorherige Experimente nicht abgedeckt wurde.

6.2.4.7. Beurteilung von Raloxifen als Drug-Repurposing Kandidat

Durch die Analysen auf verschiedenen Zellen und mit verschiedenen Reportergenen konnte die inhibitorische Aktivität als Grundlage für die Eignung von Raloxifen als Drug-Repurposing-Kandidat bestätigt werden. Dabei bewegt sich die Aktivität des Moleküls im mikromolaren Bereich. Die Konzentration im Körper bei der Behandlung postmenopausaler Osteoporose, dem indizierten und gut untersuchten Anwendungsbereich von Raloxifen, liegt bei etwa 0,5 nM (250 pg/mL) (Lee et al. 2022; Lee et al. 2023). Somit liegt die im Assay gemessene IC50 von etwa 2 μM drei Größenordnungen oberhalb der bisher untersuchten Anwendungskonzentration. Allerdings sind die Aktivitäten von Substanzen in vitro und die auf Langzeittherapie angesetzten Dosen von Therapeutika in-vivo schwer zu vergleichen und unterscheiden sich regelhaft um Größenordnungen, abhängig von Metabolismus und behandelter Krankheit. In-vitro Studien mit Raloxifen zur Anwendung gegen menschliche Brustkrebszelllinien sowie zur Untersuchung weiterer potenzieller Anwendungsgebiete nutzen ebenfalls regelmäßig Konzentrationen im mikromolaren Bereich (Musa et al. 2011; Hao et al. 2025). Daher ist auf Basis der hier gezeigten Daten kein abschließendes Urteil über Raloxifen zu fällen. Es empfiehlt sich eine weitere Erforschung, beispielsweise mit pathogenem SARS-CoV-2 und in komplexeren Umgebungen wie einem Mausexperiment, zum Sammeln weiterer Erkenntnisse. Nach Beendigung der hier gezeigten Versuche zur In-vitro-Aktivität von Raloxifen wurden Analysen der Aktivität gegen pathogenes SARS-CoV-2 publiziert, deren Ergebnisse sein Potenzial als Therapeutikum ebenfalls unterstützen (Iaconis

et al. 2022). Weiterhin wurde eine klinische Studie zu seinem Potenzial bei Patienten mit mildem bis mittelschwerem Covid-19-Verlauf durchgeführt, in der die mit Raloxifen behandelten Gruppen nach sieben Tagen einen geringeren Anteil von Teilnehmern mit detektierbarer Viruslast hatten, als die Placebogruppe und keine Nebenwirkungen festgestellt wurden (Nicastri et al. 2022). Das erhoffte Ergebnis eines Drug-Repurposing-Versuches ist die Entdeckung eines zugelassenen Moleküls, das in unveränderter Form für eine neue Erkrankung verwendet werden kann die bisherigen Ergebnisse stimmen hier optimistisch. Sollte dies am Ende weiterer klinischer Studien jedoch nicht erfolgreich sein, wäre es ebenfalls möglich, Raloxifen analog zu einer neu entdeckten Leads substanz chemisch zu modifizieren und so für die Anwendung gegen Covid-19 zu optimieren.

6.2.5. Neutralisierende Schwereketten-Antikörper gegen SARS-CoV-2-Varianten

Therapeutische Antikörper können als hochspezifische Medikamente einen entscheidenden Beitrag zur Behandlung von Infektionen mit SARS-CoV-2 leisten (Li et al. 2022; Parua et al. 2025). In der Anwendung auf Pseudoviren in den Varianten WT, Omikron/BA.2 und Omikron/BA.5 konnte die Neutralisationsaktivität der hier untersuchten Schwereketten-Antikörper abhängig vom evolutiven Fortschritt des Virus nachvollzogen werden. Dabei ist vor allem die Geschwindigkeit hervorzuheben, mit der der hier vorgestellte Assay auf aktuell zirkulierende Virusvarianten reagieren kann und daher eine Analyse dieser spezifischen Therapeutika leistet, die der Dynamik der Pandemie gewachsen ist.

Die vom Kooperationspartner bereitgestellten Schwereketten-Antikörper zeigten hohe Neutralisationswerte auf den eingesetzten Pseudoviren verschiedener Varianten von SARS-CoV-2, darunter der Wuhan-1 Wildtyp und einer Subvariante der Omicron-Linie, BA.2. Allerdings war die Wirkung auf der letzten verwendeten Omicron-Subvariante, BA.5, deutlich eingeschränkt. Da die Schwereketten-Antikörper durch Immunisierung mit Epitopen nur einer SARS-CoV-2-Variante hergestellt wurden (Eden et al. 2024), ist die konservierte Wirksamkeit auf mehreren Varianten, die innerhalb von vielen Monaten und unter globaler Verbreitung aus dem Wildtyp entstanden sind, ein Zeichen für das große Potential dieser Technik. Die Variante Omikron/BA.2 war Anfang 2022 dominant, also mehr als zwei Jahre nach Beginn der Pandemie und der dominanten Verbreitung des Wildtyp-Virus (Ma et al. 2023). Es ist zu vermuten, dass trotz dieser langen Zeit und der Mutationen an anderen Stellen des

Spikeproteins einige wichtige Epitope zwischen dem Wildtyp und Omikron/BA.2 konserviert geblieben waren und somit die neutralisierende Wirkung an sie bindender Antikörper erhalten blieb. Die mangelnde Wirksamkeit auf der Omikron/BA.5 Variante zeigt jedoch, dass in der Behandlung eines sich stark verändernden Erregers die Notwendigkeit konstanter Anpassung verbleibt und auch lange konservierte Epitope zu späterer Zeit mutieren können.

6.2.5.1. Neutralisation von SARS-CoV-2-WT-Pseudovirus

Die Anwendung des Assays zur Untersuchung neu entwickelter Schwereketten-Antikörper demonstriert die Möglichkeit, den Assay direkt in den Entwicklungsprozess hochmoderner therapeutischer Moleküle einbinden zu können. Da die Schwereketten-Antikörper auf Basis von Epitopen des Wildtyp-Virus generiert worden waren, wurden sie zunächst gegen Wildtyp-Pseudoviren getestet. Die Ergebnisse zeigen dabei nicht nur den möglichen Nachweis hochaffiner, neutralisierender Antikörper, sondern unterstreichen die Notwendigkeit eines Neutralisationsassays für diese Art von Untersuchungen. Die untersuchten Schwereketten-Antikörper wurden mittels Immunisierung von Mäusen mit der SARS-CoV-2-Spike-RBD generiert und nach ihrer Bindungsaffinität selektiert. Trotzdem waren einige der untersuchten Moleküle nicht in der Lage, die Pseudoviren zu neutralisieren (siehe Abbildung 31). Hier wird die bereits mehrfach erwähnte Notwendigkeit nicht nur hochaffiner, sondern auch korrekt lokalisierter Bindung für die Neutralisation der Virusinfektion und damit auch der Pseudovirustransduktion deutlich (Eden et al. 2024).

6.2.5.2. Neutralisation von Omikron/BA.2-Pseudovirus

Die im Vergleich zur WT-Neutralisation geringere Aktivität der Schwereketten-Antikörper auf Omikron/BA.2 Pseudoviren entspricht grundsätzlich der Erwartung. Die Generation der Schwereketten-Antikörper war mittels WT-Epitopen erfolgt, während die Entwicklung der Virusvarianten stark durch den Selektionsdruck der Immunreaktion der gesamten Bevölkerung auf die frühen Virusepitope geprägt wurde. Dies gilt insbesondere für eine spät im pandemischen Verlauf auftretende Variante mit bekannter Immunflucht-Eigenschaft wie Omikron und ihre Subvarianten. Diese traten erst zwei Jahre nach Beginn der Pandemie auf, in denen durch die globale Verbreitung des Virus eine außergewöhnliche Menge von möglichen Mutations- und Selektionsprozessen stattfinden konnte (Ma et al. 2023). Daher ist es umso erfreulicher, dass die Verringerung der Neutralisationsaktivität sich bei fünf der 10

getesteten Schwereketten-Antikörper unterhalb eines Faktors von 10 blieb (siehe Tabelle 9). Gerade wenn man den Vergleich mit den Resistenzmutationen anstellt, die HIV-1 wie gezeigt gegen niedermolekulare Therapeutika entwickelt (siehe Kapitel 5.1.1., Tabelle 4), erscheint dieser Faktor gering. In diesem Versuch wurde zusätzlich die Bedeutung der verwendeten Zellen deutlich. Die Hemmung von WT-Pseudovirus durch die Schwereketten-Antikörper war in diesem Assay mit HEK293T-ACE2-Zellen schwächer ausgeprägt als im zuvor mit CaCo2-Zellen durchgeführten Assay. Dies ist vermutlich auf die besonders hohe ACE2-Expression der HEK293T-ACE2-Zellen zurückzuführen, die eine wichtige Rolle bei der Transduzierbarkeit von Zellen spielt (Bartolomeo et al. 2022). Auch wenn CaCo2-Zellen eine besonders hohe endogene ACE2-Expression aufweisen (Sherman und Emmer 2021), ist davon auszugehen, dass diese in den spezifisch zur Überexpression transduzierten und FACS-selektierten HEK293T-ACE2 Zellen noch stärker ausgeprägt ist. Die Bindung von Antikörpern wäre in diesem Fall einer stärkeren Konkurrenz ausgesetzt sein, die weniger starke Neutralisation bei geringen Dosen begründen könnte.

6.2.5.3. Keine Neutralisation von Omikron/BA.5-Pseudovirus

Die Notwendigkeit einer kleinteiligen Untersuchung von therapeutisch vielversprechenden Molekülen wird durch die Ergebnisse des Assays mit Omikron/BA.5-Pseudovirus unterstrichen. In diesem Assay zeigte keiner der Schwereketten-Antikörper mehr eine messbare Neutralisation (siehe Abbildung 33 und Tabelle 11). Der Mutationsschritt zwischen Omikron/BA.2 und BA.5 scheint an den entscheidenden Epitopen Veränderungen mit sich gebracht zu haben, die für die Bindung der Schwereketten-Antikörper und damit für die Neutralisation des (Pseudo)Viruspartikels entscheidend sind. Die immunologischen Unterschiede zwischen Omikron/BA.2 und BA.5 sind bekannt und spielen auch für die körpereigene Immunantwort eine wichtige Rolle (Rössler et al. 2022; Cao et al. 2022).

7. Fazit - Lentivirale Vektor-Assays als virologische Methode

In dieser Arbeit wurden verschiedenste Anwendungen von lentiviralen Vektoren in der virologischen Forschung dargestellt. Die damit entwickelten Pseudovirusassays haben eine Vielzahl von Daten generiert, die relevant für die Untersuchung, Identifikation und Entwicklung von Therapeutika sind. Dabei stellt gerade die Untersuchung von gleich zwei global hoch relevanten Erregern einen Nachweis der Flexibilität der Assays dar. Es wurde gezeigt, wie anhand der HIV-1 entlehnten Virusbiologie eine ganze Reihe essenzieller Erkenntnisse über Wirkstoffkandidaten gewonnen werden kann. Dabei ermöglichen die lentiviralen Vektoren die Arbeit unter Biosicherheitslevel 2 und die unkomplizierte Nutzung von Reportergenen wie eGFP und Luciferase. Dies steht im Gegensatz zur Arbeit mit pathogenem HIV-1, die deutlich erhöhte Sicherheitsvorkehrungen voraussetzt und einen ungleich größeren Aufwand in der Auslesung von Signalen mit sich bringt. Durch die Nutzung des Luciferase-Reporters und der Einstufung in Biosicherheitsstufe 2 kann der Assay im automatisierten Hochdurchsatzverfahren eingesetzt werden. Darüber hinaus können in den lentiviralen Vektoren wie demonstriert multiresistente Mutanten erzeugt werden, deren Einbringung in pathogene Viren ein unvertretbares Sicherheitsrisiko darstellen würde.

Hierdurch können die Wirkstoffe entsprechend des in der Entwicklung wichtigen Mantras “fail early, fail cheap” auf eine der wichtigsten Messlatten für neue Therapeutika geprüft werden: die Eignung als Ergänzung bisheriger Behandlungsoptionen in Fällen, in denen das zurzeit verfügbare Arsenal ausgeschöpft ist, wie bei den zum Beispiel in Südafrika massenhaft auftretenden Resistenzmutationen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden Analysen zur Bekämpfung von SARS-CoV-2 behandelt, die hier wieder innerhalb eines Erregers ganz verschiedene Aspekte umfasst. Die Analysen gehen von der Untersuchung der Immunreaktion und Impfung über die Entwicklung neuer und das Repurposing “alter” Medikamente bis hin zur Entwicklung neuartiger Therapieansätze wie Nanobody-basierte Schwereketten-Antikörper. Damit ermöglicht der Pseudovirusassay auf vielen Ebenen den Kampf gegen ein global zirkulierendes pandemisches Virus auf dem Spektrum zwischen Grundlagenforschung und Therapieentwicklung.

Mit dem SARS-CoV-2-Pseudovirusassay konnten in Kooperationsprojekten Analysen durchgeführt werden, für die es keine kommerzielle Lösung gab. Die parallele Testung von

mehreren Substanzen in einem Ansatz und die einfache Auslesemöglichkeit innerhalb von zwei Tagen erlaubte die schnelle Reaktion auf akute Forschungsfragen und zeigte durch konsistente Ergebnisse die hohe technische Ausgereiftheit des Assays.

Der hier beschriebene, sowohl entwickelte als auch angewandte Assay wird in modifizierter Form bereits von anderen Forschungsgruppen verwendet und hat sich damit über den unmittelbaren Kontext dieser Arbeit hinaus als vielseitig nutzbare Plattform etabliert. So plant die Arbeitsgruppe von Prof. Marylyn Addo (UKE, Hamburg) seine Nutzung zur Untersuchung von Impfstoffkandidaten gegen SARS-CoV-2. Die Leibniz-Nachwuchsgruppe von Dr. Lisa Oestereich (BNITM, Hamburg) nutzt ihn zur Untersuchung rekonvaleszenter Seren nach Lassa-Virus-Infektionen. Zu guter Letzt wurde der Assay in die im Sonderforschungsbereich 1648 „Neu auftretende Viren: Pathogenese, Struktur und Immunität“ (UKE, Hamburg) etablierten Serviceprojekte integriert.

Damit zeigt diese Arbeit nicht nur die vielseitigen Anwendungsmöglichkeiten lentiviraler Vektoren in der virologischen Forschung, sondern demonstriert auch, wie aus ihrer Nutzung robuste, skalierbare und flexibel adaptierbare Assays entstehen können. Der entwickelte Pseudovirusassay stellt somit nicht allein ein Werkzeug zur Beantwortung spezifischer Forschungsfragen dar, sondern eine breit einsetzbare methodische Plattform an der Schnittstelle von Grundlagenforschung, translationaler Forschung und Therapieentwicklung.

8. Literaturverzeichnis

- Abram, Michael E.; Ferris, Andrea L.; Shao, Wei; Alvord, W. Gregory; Hughes, Stephen H. (2010): Nature, position, and frequency of mutations made in a single cycle of HIV-1 replication. In: *Journal of virology* 84 (19), S. 9864–9878. DOI: 10.1128/JVI.00915-10.
- Al-Jahdhami, Issa; Al-Mawali, Adhra; Bennji, Sami M. (2022): Respiratory Complications after COVID-19. In: *Oman medical journal* 37 (1), e343. DOI: 10.5001/omj.2022.52.
- Al-Omari, Awad; Rabaan, Ali A.; Salih, Samer; Al-Tawfiq, Jaffar A.; Memish, Ziad A. (2019): MERS coronavirus outbreak: Implications for emerging viral infections. In: *Diagnostic microbiology and infectious disease* 93 (3), S. 265–285. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2018.10.011.
- An, W. Frank; Tolliday, Nicola (2010): Cell-based assays for high-throughput screening. In: *Molecular biotechnology* 45 (2), S. 180–186. DOI: 10.1007/s12033-010-9251-z.
- Assefa, Yibeltal; Gilks, Charles F. (2020): Ending the epidemic of HIV/AIDS by 2030: Will there be an endgame to HIV, or an endemic HIV requiring an integrated health systems response in many countries? In: *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases* 100, S. 273–277. DOI: 10.1016/j.ijid.2020.09.011.
- Asselah, Tarik; Durantel, David; Pasmant, Eric; Lau, George; Schinazi, Raymond F. (2021): COVID-19: Discovery, diagnostics and drug development. In: *Journal of hepatology* 74 (1), S. 168–184. DOI: 10.1016/j.jhep.2020.09.031.
- Avanzato, Victoria A.; Matson, M. Jeremiah; Seifert, Stephanie N.; Pryce, Rhys; Williamson, Brandi N.; Anzick, Sarah L. et al. (2020): Case Study: Prolonged Infectious SARS-CoV-2 Shedding from an Asymptomatic Immunocompromised Individual with Cancer. In: *Cell* 183 (7), 1901-1912.e9. DOI: 10.1016/j.cell.2020.10.049.
- Awada, Abraham; Thorball, Christian W.; Timonina, Valeriia; Carrington, Mary; McLaren, Paul J.; Fellay, Jacques (2026): Human genetics of HIV infection. In: *Current opinion in virology* 76, S. 101535. DOI: 10.1016/j.coviro.2026.101535.
- Azhar, Esam I.; Hui, David S. C.; Memish, Ziad A.; Drosten, Christian; Zumla, Alimuddin (2019): The Middle East Respiratory Syndrome (MERS). In: *Infectious disease clinics of North America* 33 (4), S. 891–905. DOI: 10.1016/j.idc.2019.08.001.
- Azijn, Hilde; Tirry, Ilse; Vingerhoets, Johan; Béthune, Marie-Pierre de; Kraus, Guenter; Boven, Katia et al. (2010): TMC278, a next-generation nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI), active against wild-type and NNRTI-resistant HIV-1. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54 (2), S. 718–727. DOI: 10.1128/AAC.00986-09.
- Bartolomeo, Cynthia Silva; Lemes, Robertha Mariana Rodrigues; Morais, Rafael Leite; Pereria, Gabriela Cruz; Nunes, Tamires Alves; Costa, Angelica Jardim et al. (2022): SARS-CoV-2 infection and replication kinetics in different human cell types: The role of autophagy, cellular metabolism and ACE2 expression. In: *Life Sciences* 308, S. 120930. DOI: 10.1016/j.lfs.2022.120930.
- Bartosch, Birke; Cosset, Francois-Loic (2004): Strategies for retargeted gene delivery using vectors derived from lentiviruses. In: *Current gene therapy* 4 (4), S. 427–443. DOI: 10.2174/1566523043345995.
- Baxter, John D.; Schapiro, Jonathan M.; Boucher, Charles A. B.; Kohlbrenner, Veronika M.; Hall, David B.; Scherer, Joseph R.; Mayers, Douglas L. (2006): Genotypic changes in human immunodeficiency virus type 1 protease associated with reduced susceptibility and virologic response to the protease inhibitor tipranavir. In: *Journal of virology* 80 (21), S. 10794–10801. DOI: 10.1128/JVI.00712-06.
- Bayati, Armin; Kumar, Rahul; Francis, Vincent; McPherson, Peter S. (2021): SARS-CoV-2 infects cells after viral entry via clathrin-mediated endocytosis. In: *The Journal of Biological Chemistry* 296, S. 100306. DOI: 10.1016/j.jbc.2021.100306.

- Beyer, Winfried R.; Westphal, Manfred; Ostertag, Wolfram; Laer, Dorothee von (2002): Oncoretrovirus and lentivirus vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein: generation, concentration, and broad host range. In: *Journal of virology* 76 (3), S. 1488–1495. DOI: 10.1128/jvi.76.3.1488-1495.2002.
- Blay, Vincent; Tolani, Bhairavi; Ho, Sunita P.; Arkin, Michelle R. (2020): High-Throughput Screening: today's biochemical and cell-based approaches. In: *Drug discovery today* 25 (10), S. 1807–1821. DOI: 10.1016/j.drudis.2020.07.024.
- Boffito, Marta; Back, David J.; Blaschke, Terrence F.; Rowland, Malcolm; Bertz, Richard J.; Gerber, John G.; Miller, Veronica (2003): Protein binding in antiretroviral therapies. In: *AIDS research and human retroviruses* 19 (9), S. 825–835. DOI: 10.1089/088922203769232629.
- Bojkova, Denisa; Steinhorst, Katja; Bechtel, Marco; Zoeller, Nadja; Doll, Monika; Ott, Melanie et al. (2026): Discovery of synthetic G-quadruplex DNA as SARS-CoV-2 helicase inhibitor with antiviral, anti-inflammatory and antioxidative properties. In: *Cell death discovery* 12 (1). DOI: 10.1038/s41420-026-03006-0.
- Cai, Zhaohui; Kalkeri, Raj; Wang, Mi; Haner, Benjamin; Dent, Dominic; Osman, Bahar et al. (2024): Validation of a Pseudovirus Neutralization Assay for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2: A High-Throughput Method for the Evaluation of Vaccine Immunogenicity. In: *Microorganisms* 12 (6). DOI: 10.3390/microorganisms12061201.
- Cao, Yunlong; Su, Bin; Guo, Xianghua; Sun, Wenjie; Deng, Yongqiang; Bao, Linlin et al. (2020): Potent Neutralizing Antibodies against SARS-CoV-2 Identified by High-Throughput Single-Cell Sequencing of Convalescent Patients' B Cells. In: *Cell* 182 (1), 73-84.e16. DOI: 10.1016/j.cell.2020.05.025.
- Cao, Yunlong; Yisimayi, Ayijiang; Jian, Fanchong; Song, Weiliang; Xiao, Tianhe; Wang, Lei et al. (2022): BA.2.12.1, BA.4 and BA.5 escape antibodies elicited by Omicron infection. In: *Nature* 608 (7923), S. 593–602. DOI: 10.1038/s41586-022-04980-y.
- Cele, Sandile; Karim, Farina; Lustig, Gila; San, James Emmanuel; Hermanus, Tandile; Tegally, Houriiyah et al. (2022): SARS-CoV-2 prolonged infection during advanced HIV disease evolves extensive immune escape. In: *Cell host & microbe* 30 (2), 154-162.e5. DOI: 10.1016/j.chom.2022.01.005.
- Chang, Max W.; Giffin, Michael J.; Muller, Rolf; Savage, Jeremiah; Lin, Ying C.; Hong, Sukwon et al. (2010): Identification of broad-based HIV-1 protease inhibitors from combinatorial libraries. In: *The Biochemical journal* 429 (3), S. 527–532. DOI: 10.1042/BJ20091645.
- Chiyyeadu, Abhishek; Asgedom, Girmay; Bruhn, Matthias; Rocha, Cheila; Schlegel, Tom U.; Neumann, Thomas et al. (2024): A tetravalent bispecific antibody outperforms the combination of its parental antibodies and neutralizes diverse SARS-CoV-2 variants. In: *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 260, S. 109902. DOI: 10.1016/j.clim.2024.109902.
- Choi, Bina; Choudhary, Manish C.; Regan, James; Sparks, Jeffrey A.; Padera, Robert F.; Qiu, Xueting et al. (2020): Persistence and Evolution of SARS-CoV-2 in an Immunocompromised Host. In: *The New England journal of medicine* 383 (23), S. 2291–2293. DOI: 10.1056/NEJMc2031364.
- Choi, Jun Yong; Smith, Davey M. (2021): SARS-CoV-2 Variants of Concern. In: *Yonsei medical journal* 62 (11), S. 961–968. DOI: 10.3349/ymj.2021.62.11.961.
- Clark, Shauna A.; Shulman, Nancy S.; Bosch, Ronald J.; Mellors, John W. (2006): Reverse transcriptase mutations 118I, 208Y, and 215Y cause HIV-1 hypersusceptibility to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. In: *AIDS* 20 (7), S. 981–984. DOI: 10.1097/01.aids.0000222069.14878.44.
- Cornils, Kerstin; Thielecke, Lars; Hüser, Svenja; Forgber, Michael; Thomaschewski, Michael; Kleist, Nadja et al. (2014): Multiplexing clonality: combining RGB marking and genetic barcoding. In: *Nucleic acids research* 42 (7), e56. DOI: 10.1093/nar/gku081.

- Cortese, Mirko; Lee, Ji-Young; Cerikan, Berati; Neufeldt, Christopher J.; Oorschot, Viola M. J.; Köhrer, Sebastian et al. (2020): Integrative Imaging Reveals SARS-CoV-2-Induced Reshaping of Subcellular Morphologies. In: *Cell host & microbe* 28 (6), 853–866.e5. DOI: 10.1016/j.chom.2020.11.003.
- Cowan, Juthaporn; Amson, Ashley; Christofides, Anna; Chagla, Zain (2023): Monoclonal antibodies as COVID-19 prophylaxis therapy in immunocompromised patient populations. In: *International journal of infectious diseases* 134, S. 228–238. DOI: 10.1016/j.ijid.2023.06.021.
- Cronin, James; Zhang, Xian-Yang; Reiser, Jakob (2005): Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping. In: *Current gene therapy* 5 (4), S. 387–398. DOI: 10.2174/1566523054546224.
- Cubuk, Jasmine; Alston, Jhullian J.; Incicco, J. Jeremías; Singh, Sukrit; Stuchell-Brereton, Melissa D.; Ward, Michael D. et al. (2021): The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein is dynamic, disordered, and phase separates with RNA. In: *Nature communications* 12 (1), S. 1936. DOI: 10.1038/s41467-021-21953-3.
- Custódio, Tânia F.; Das, Hrishikesh; Sheward, Daniel J.; Hanke, Leo; Pazicky, Samuel; Pieprzyk, Joanna et al. (2020): Selection, biophysical and structural analysis of synthetic nanobodies that effectively neutralize SARS-CoV-2. In: *Nature communications* 11 (1), S. 5588. DOI: 10.1038/s41467-020-19204-y.
- Das, A. T.; Koken, S. E.; Essink, B. B.; van Wamel, J. L.; Berkhout, B. (1994): Human immunodeficiency virus uses tRNA(Lys,3) as primer for reverse transcription in HeLa-CD4+ cells. In: *FEBS letters* 341 (1), S. 49–53. DOI: 10.1016/0014-5793(94)80238-6.
- Drosten, Christian; Günther, Stephan; Preiser, Wolfgang; van der Werf, Sylvie; Brodt, Hans-Reinhard; Becker, Stephan et al. (2003): Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. In: *The New England journal of medicine* 348 (20), S. 1967–1976. DOI: 10.1056/NEJMoa030747.
- Dull, T.; Zufferey, R.; Kelly, M.; Mandel, R. J.; Nguyen, M.; Trono, D.; Naldini, L. (1998): A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. In: *Journal of virology* 72 (11), S. 8463–8471. DOI: 10.1128/JVI.72.11.8463-8471.1998.
- Eden, Thomas; Schaffrath, Alessa Z.; Wesolowski, Janusz; Stähler, Tobias; Tode, Natalie; Richter, Nathalie et al. (2024): Generation of nanobodies from transgenic 'LamaMice' lacking an endogenous immunoglobulin repertoire. In: *Nature communications* 15 (1), S. 4728. DOI: 10.1038/s41467-024-48735-x.
- Ellinger, Bernhard; Bojkova, Denisa; Zaliani, Andrea; Cinatl, Jindrich; Claussen, Carsten; Westhaus, Sandra et al. (2021): A SARS-CoV-2 cytopathicity dataset generated by high-content screening of a large drug repurposing collection. In: *Scientific data* 8 (1), S. 70. DOI: 10.1038/s41597-021-00848-4.
- Ellinger, Bernhard; Pohlmann, Daniel; Woens, Jannis; Jäkel, Felix M.; Reinshagen, Jeanette; Stocking, Carol et al. (2020): A High-Throughput HIV-1 Drug Screening Platform, Based on Lentiviral Vectors and Compatible with Biosafety Level-1. In: *Viruses* 12 (5). DOI: 10.3390/v12050580.
- Elrobaa, Islam H.; New, Karl J. (2021): COVID-19: Pulmonary and Extra Pulmonary Manifestations. In: *Frontiers in public health* 9, S. 711616. DOI: 10.3389/fpubh.2021.711616.
- Endo, Akira; Abbott, Sam; Kucharski, Adam J.; Funk, Sebastian (2020): Estimating the overdispersion in COVID-19 transmission using outbreak sizes outside China. In: *Wellcome open research* 5, S. 67. DOI: 10.12688/wellcomeopenres.15842.3.
- Enk, Leon U. B.; Hellmig, Malte; Riecken, Kristoffer; Kilian, Christoph; Datlinger, Paul; Jauch-Speer, Saskia L. et al. (2024): Targeting T cell plasticity in kidney and gut inflammation by pooled single-cell CRISPR screening. In: *Science immunology* 9 (96), eadd6774. DOI: 10.1126/sciimmunol.add6774.
- Eshraghi, Adrien A.; Mirsaiedi, Mehdi; Davies, Camron; Telischi, Fred F.; Chaudhari, Nirupa; Mittal, Rahul (2020): Potential Mechanisms for COVID-19 Induced Anosmia and Dysgeusia. In: *Frontiers in Physiology* 11, S. 1039. DOI: 10.3389/fphys.2020.01039.

- Fanale-Belasio, Emanuele; Raimondo, Mariangela; Suligoi, Barbara; Buttò, Stefano (2010): HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. In: *Annali dell'Istituto superiore di sanita* 46 (1), S. 5–14. DOI: 10.4415/ANN_10_01_02.
- Fehr, Anthony R.; Perlman, Stanley (2015): Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. In: *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 1282, S. 1–23. DOI: 10.1007/978-1-4939-2438-7_1.
- Fehse, B.; Kustikova, O. S.; Bubenheim, M.; Baum, C. (2004): Poisson--it's a question of dose. In: *Gene therapy* 11 (11), S. 879–881. DOI: 10.1038/sj.gt.3302270.
- Feng, Youjun; Gao, George F. (2007): Towards our understanding of SARS-CoV, an emerging and devastating but quickly conquered virus. In: *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 30 (5-6), S. 309–327. DOI: 10.1016/j.cimid.2007.05.009.
- Freed, Eric O. (2015): HIV-1 assembly, release and maturation. In: *Nature reviews. Microbiology* 13 (8), S. 484–496. DOI: 10.1038/nrmicro3490.
- Fung, Monica; Nambiar, Ashok; Pandey, Suchi; Aldrich, J. Matthew; Teraoka, Justin; Freise, Christopher et al. (2021): Treatment of immunocompromised COVID-19 patients with convalescent plasma. In: *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society* 23 (2), e13477. DOI: 10.1111/tid.13477.
- Gaebler, Christian; Kor, Samad; Allers, Kristina; Perotti, Michela; Mwangi, David; Meixenberger, Karolin et al. (2026): Sustained HIV-1 remission after heterozygous CCR5Δ32 stem cell transplantation. In: *Nature* 650 (8102), S. 701–709. DOI: 10.1038/s41586-025-09893-0.
- Galanopoulos, Michail; Gkeros, Filippou; Doukatas, Aris; Karianakis, Grigorios; Pontas, Christos; Tsoukalas, Nikolaos et al. (2020): COVID-19 pandemic: Pathophysiology and manifestations from the gastrointestinal tract. In: *World Journal of Gastroenterology* 26 (31), S. 4579–4588. DOI: 10.3748/wjg.v26.i31.4579.
- Galmiche, Simon; Luong Nguyen, Liem Binh; Tartour, Eric; Lamballerie, Xavier de; Wittkop, Linda; Loubet, Paul; Launay, Odile (2022): Immunological and clinical efficacy of COVID-19 vaccines in immunocompromised populations: a systematic review. In: *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 28 (2), S. 163–177. DOI: 10.1016/j.cmi.2021.09.036.
- Gao, Cuige; Yi, Jiang; Baidoo, Adam; Liu, Dongfang; Li, Jing; Li, Dongyang et al. (2025): Comparative analysis of neutralization assays performed using live SARS-CoV-2 virus and pseudovirus to assess immunogenicity of a bivalent SARS-CoV-2 protein vaccine in humans. In: *Frontiers in immunology* 16, S. 1650083. DOI: 10.3389/fimmu.2025.1650083.
- Gelderblom, H. R. (1991): Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. In: *AIDS (London, England)* 5 (6), S. 617–637. DOI: 10.1097/00002030-199106000-00001.
- Giroglou, Tsanan; Cinatl, Jindrich; Rabenau, Holger; Drosten, Christian; Schwalbe, Harald; Doerr, Hans Wilhelm; Laer, Dorothee von (2004): Retroviral vectors pseudotyped with severe acute respiratory syndrome coronavirus S protein. In: *Journal of virology* 78 (17), S. 9007–9015. DOI: 10.1128/JVI.78.17.9007-9015.2004.
- Gomez-Nicola, Diego; Riecken, Kristoffer; Fehse, Boris; Perry, V. Hugh (2014): In-vivo RGB marking and multicolour single-cell tracking in the adult brain. In: *Scientific reports* 4, S. 7520. DOI: 10.1038/srep07520.
- Gordon, David E.; Jang, Gwendolyn M.; Bouhaddou, Mehdi; Xu, Jiewei; Obernier, Kirsten; White, Kris M. et al. (2020): A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. In: *Nature* 583 (7816), S. 459–468. DOI: 10.1038/s41586-020-2286-9.

- Gote, Vrinda; Bolla, Pradeep Kumar; Kommineni, Nagavendra; Butreddy, Arun; Nukala, Pavan Kumar; Palakurthi, Sushesh Srivatsa; Khan, Wahid (2023): A Comprehensive Review of mRNA Vaccines. In: *International journal of molecular sciences* 24 (3). DOI: 10.3390/ijms24032700.
- Gremminger, Thomas; Song, Zhenwei; Ji, Juan; Foster, Avery; Weng, Kexin; Heng, Xiao (2020): Extended Interactions between HIV-1 Viral RNA and tRNA^{Lys3} Are Important to Maintain Viral RNA Integrity. In: *International journal of molecular sciences* 22 (1). DOI: 10.3390/ijms22010058.
- Grundeis, Felicitas; Ansems, Kelly; Dahms, Karolina; Thieme, Volker; Metzendorf, Maria-Inti; Skoetz, Nicole et al. (2023): Remdesivir for the treatment of COVID-19. In: *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 1 (1), CD014962. DOI: 10.1002/14651858.CD014962.pub2.
- Gupta, Gautam; Buonsenso, Danilo; Wood, John; Mohandas, Sindhu; Warburton, David (2025): Mechanistic Insights Into Long Covid: Viral Persistence, Immune Dysregulation, and Multi-Organ Dysfunction. In: *Comprehensive Physiology* 15 (3), e70019. DOI: 10.1002/cph4.70019.
- Halas, Ramona-Georgiana; Berceanu Vaduva, Delia Mira; Radulescu, Matilda; Bredicean, Ana-Cristina; Mateescu, Diana-Maria; Toma, Ana-Olivia et al. (2025): Long COVID Prevalence and Risk Factors: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. In: *Biomedicine* 13 (12), S. 2859. DOI: 10.3390/biomedicine13122859.
- Hannum, Mackenzie E.; Koch, Riley J.; Ramirez, Vicente A.; Marks, Sarah S.; Toskala, Aurora K.; Herriman, Riley D. et al. (2023): Taste loss as a distinct symptom of COVID-19: a systematic review and meta-analysis. In: *Chemical senses* 48. DOI: 10.1093/chemse/bjad043.
- Hao, Xiangyu; Wang, Yifan; Hou, Ming-Jie; Liao, Lixi; Yang, Yong Xiao; Wang, Ying-Hua; Zhu, Bao Ting (2025): Raloxifene Prevents Chemically-Induced Ferroptotic Neuronal Death In Vitro and In Vivo. In: *Molecular neurobiology* 62 (3), S. 3934–3955. DOI: 10.1007/s12035-024-04497-7.
- Hardy, Isabelle; Brenner, Bluma; Quashie, Peter; Thomas, Réjean; Petropoulos, Christos; Huang, Wei et al. (2015): Evolution of a novel pathway leading to dolutegravir resistance in a patient harbouring N155H and multiclass drug resistance. In: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 70 (2), S. 405–411. DOI: 10.1093/jac/dku387.
- Hart, William S.; Maini, Philip K.; Thompson, Robin N. (2021): High infectiousness immediately before COVID-19 symptom onset highlights the importance of continued contact tracing. In: *eLife* 10. DOI: 10.7554/eLife.65534.
- Harvey, William T.; Carabelli, Alessandro M.; Jackson, Ben; Gupta, Ravindra K.; Thomson, Emma C.; Harrison, Ewan M. et al. (2021): SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. In: *Nature reviews. Microbiology* 19 (7), S. 409–424. DOI: 10.1038/s41579-021-00573-0.
- Hashemian, Seyed Mohammad Reza; Sheida, Amirhossein; Taghizadieh, Mohammad; Memar, Mohammad Yousef; Hamblin, Michael R.; Bannazadeh Baghi, Hossein et al. (2023): Paxlovid (Nirmatrelvir/Ritonavir): A new approach to Covid-19 therapy? In: *Biomedicine & Pharmacotherapy* 162, S. 114367. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.114367.
- Hill, Andrew; Beitelshees, Marie; Pfeifer, Blaine A. (2021): Vaccine Delivery and Immune Response Basics. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2183, S. 1–8. DOI: 10.1007/978-1-0716-0795-4_1.
- Horn, Michael P.; Jonsdottir, Hulda R.; Brigger, Daniel; Damonti, Lauro; Suter-Riniker, Franziska; Endrich, Olga et al. (2022): Serological testing for SARS-CoV-2 antibodies in clinical practice: A comparative diagnostic accuracy study. In: *Allergy* 77 (7), S. 2090–2103. DOI: 10.1111/all.15206.
- Hu, Ben; Guo, Hua; Zhou, Peng; Shi, Zheng-Li (2021): Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. In: *Nature reviews. Microbiology* 19 (3), S. 141–154. DOI: 10.1038/s41579-020-00459-7.
- Huang, Chaolin; Wang, Yeming; Li, Xingwang; Ren, Lili; Zhao, Jianping; Hu, Yi et al. (2020): Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. In: *Lancet (London, England)* 395 (10223), S. 497–506. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.

- Hughes, J. P.; Rees, S.; Kalindjian, S. B.; Philpott, K. L. (2011): Principles of early drug discovery. In: *British Journal of Pharmacology* 162 (6), S. 1239–1249. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x.
- Hurst, Kelley R.; Koetzner, Cheri A.; Masters, Paul S. (2009): Identification of in vivo-interacting domains of the murine coronavirus nucleocapsid protein. In: *Journal of virology* 83 (14), S. 7221–7234. DOI: 10.1128/JVI.00440-09.
- Hurt, Aeron C.; Wheatley, Adam K. (2021): Neutralizing Antibody Therapeutics for COVID-19. In: *Viruses* 13 (4). DOI: 10.3390/v13040628.
- Hütter, Gero; Nowak, Daniel; Mossner, Maximilian; Ganepola, Susanne; Müssig, Arne; Allers, Kristina et al. (2009): Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. In: *The New England journal of medicine* 360 (7), S. 692–698. DOI: 10.1056/NEJMoa0802905.
- Iaconis, Daniela; Bordi, Licia; Matusali, Giulia; Talarico, Carmine; Manelfi, Candida; Cesta, Maria Candida et al. (2022): Characterization of raloxifene as a potential pharmacological agent against SARS-CoV-2 and its variants. In: *Cell death & disease* 13 (5), S. 498. DOI: 10.1038/s41419-022-04961-z.
- Iwamoto, M.; LA Wenning; Petry, A. S.; Laethem, M.; Smet, M. de; Kost, J. T. et al. (2008): Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of Raltegravir After Single and Multiple Doses in Healthy Subjects. In: *Clin Pharmacol Ther* 83 (2), S. 293–299. DOI: 10.1038/sj.clpt.6100281.
- Joglekar, Alok V.; Sandoval, Salemez (2017): Pseudotyped Lentiviral Vectors: One Vector, Many Guises. In: *Human gene therapy methods* 28 (6), S. 291–301. DOI: 10.1089/hgtb.2017.084.
- Johnson, Marc C.; Lyddon, Terri D.; Suarez, Reinier; Salcedo, Braxton; LePique, Mary; Graham, Maddie et al. (2020): Optimized Pseudotyping Conditions for the SARS-COV-2 Spike Glycoprotein. In: *Journal of virology* 94 (21). DOI: 10.1128/JVI.01062-20.
- Jones, Letitia D.; Moody, M. Anthony; Thompson, Amelia B. (2020): Innovations in HIV-1 Vaccine Design. In: *Clinical therapeutics* 42 (3), S. 499–514. DOI: 10.1016/j.clinthera.2020.01.009.
- Karlinsky, Ariel; Kobak, Dmitry (2021): Tracking excess mortality across countries during the COVID-19 pandemic with the World Mortality Dataset. In: *eLife* 10. DOI: 10.7554/eLife.69336.
- Ke, Zunlong; Oton, Joaquin; Qu, Kun; Cortese, Mirko; Zila, Vojtech; McKeane, Lesley et al. (2020): Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions. In: *Nature* 588 (7838), S. 498–502. DOI: 10.1038/s41586-020-2665-2.
- Kemp, Steven A.; Collier, Dami A.; Datir, Rawlings P.; Ferreira, Isabella A. T. M.; Gayed, Salma; Jahun, Aminu et al. (2021): SARS-CoV-2 evolution during treatment of chronic infection. In: *Nature* 592 (7853), S. 277–282. DOI: 10.1038/s41586-021-03291-y.
- Kim, Dongwan; Lee, Joo-Yeon; Yang, Jeong-Sun; Kim, Jun Won; Kim, V. Narry; Chang, Hyeshik (2020): The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. In: *Cell* 181 (4), 914–921.e10. DOI: 10.1016/j.cell.2020.04.011.
- Kim, Jiae; Vasan, Sandhya; Kim, Jerome H.; Ake, Julie A. (2021): Current approaches to HIV vaccine development: a narrative review. In: *Journal of the International AIDS Society* 24 Suppl 7 (Suppl 7), e25793. DOI: 10.1002/jia2.25793.
- Kino, Tomoshige; Burd, Irina; Segars, James H. (2021): Dexamethasone for Severe COVID-19: How Does It Work at Cellular and Molecular Levels? In: *International journal of molecular sciences* 22 (13). DOI: 10.3390/ijms22136764.
- Koch, Jana; Uckele, Zina M.; Doldan, Patricio; Stanifer, Megan; Boulant, Steeve; Lozach, Pierre-Yves (2021): TMPRSS2 expression dictates the entry route used by SARS-CoV-2 to infect host cells. In: *The EMBO journal* 40 (16), e107821. DOI: 10.15252/embj.2021107821.
- Kontorinis, Nickolas; Dieterich, Douglas T. (2003): Toxicity of non-nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors. In: *Seminars in liver disease* 23 (2), S. 173–182. DOI: 10.1055/s-2003-39948.

- Korber, Bette; Fischer, Will M.; Gnanakaran, Sandrasegaram; Yoon, Hyejin; Theiler, James; Abfalterer, Werner et al. (2020): Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. In: *Cell* 182 (4), 812-827.e19. DOI: 10.1016/j.cell.2020.06.043.
- Koźlik, Maciej; Błahuszewska, Adrianna; Kaźmierski, Maciej (2022): Cardiovascular System during SARS-CoV-2 Infection. In: *International journal of environmental research and public health* 19 (3). DOI: 10.3390/ijerph19031184.
- Kräusslich, Hans-Georg; Bartenschlager, Ralf (Hg.) (2008): *Antiviral Strategies*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Handbook of Experimental Pharmacology, 189). Online verfügbar unter <http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:31-epflicht-1587309>.
- Kretschmer, Maibritt; Kadlubowska, Patrycja; Hoffmann, Daniel; Schwalbe, Birco; Auerswald, Heidi; Schreiber, Michael (2020): Zikavirus prME Envelope Pseudotyped Human Immunodeficiency Virus Type-1 as a Novel Tool for Glioblastoma-Directed Virotherapy. In: *Cancers* 12 (4). DOI: 10.3390/cancers12041000.
- Kuzikov, Maria; Woens, Jannis; Zaliani, Andrea; Hambach, Julia; Eden, Thomas; Fehse, Boris et al. (2022): High-throughput drug screening allowed identification of entry inhibitors specifically targeting different routes of SARS-CoV-2 Delta and Omicron/BA.1. In: *Biomedicine & Pharmacotherapy* 151, S. 113104. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113104.
- Lamb, Yvette N. (2020): Remdesivir: First Approval. In: *Drugs* 80 (13), S. 1355–1363. DOI: 10.1007/s40265-020-01378-w.
- Lee, Hae Won; Kang, Woo Youl; Gwon, Mi-Ri; Park, Soo-Jin; Cho, Kyunghee; Seong, Sook Jin; Yoon, Young-Ran (2023): Comparative Pharmacokinetic Profiles of a Novel Low-Dose Micronized Formulation of Raloxifene 45 mg (AD-101) and the Conventional Raloxifene 60 mg in Healthy Subjects. In: *Clinical pharmacology in drug development* 12 (12), S. 1204–1210. DOI: 10.1002/cpdd.1319.
- Lee, Hae Won; Kang, Woo Youl; Jung, Wookjae; Gwon, Mi-Ri; Cho, Kyunghee; Lee, Backhwan et al. (2022): Pharmacokinetic Drug Interaction Between Raloxifene and Cholecalciferol in Healthy Volunteers. In: *Clinical pharmacology in drug development* 11 (5), S. 623–631. DOI: 10.1002/cpdd.1062.
- Li, Dapeng; Sempowski, Gregory D.; Saunders, Kevin O.; Acharya, Priyamvada; Haynes, Barton F. (2022): SARS-CoV-2 Neutralizing Antibodies for COVID-19 Prevention and Treatment. In: *Annual review of medicine* 73, S. 1–16. DOI: 10.1146/annurev-med-042420-113838.
- Li, Guangdi; Hilgenfeld, Rolf; Whitley, Richard; Clercq, Erik de (2023): Therapeutic strategies for COVID-19: progress and lessons learned. In: *Nature reviews. Drug discovery* 22 (6), S. 449–475. DOI: 10.1038/s41573-023-00672-y.
- Liang, Yajie; Li, Kaizhen; Riecken, Kristoffer; Maslyukov, Anatoliy; Gomez-Nicola, Diego; Kovalchuk, Yury et al. (2016): Long-term in vivo single-cell tracking reveals the switch of migration patterns in adult-born juxtaglomerular cells of the mouse olfactory bulb. In: *Cell research* 26 (7), S. 805–821. DOI: 10.1038/cr.2016.55.
- Lipinski, C. A. (2000): Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. In: *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 44 (1), S. 235–249. DOI: 10.1016/S1056-8719(00)00107-6.
- Loiodice, Simon; Da Nogueira Costa, Andre; Atienzar, Franck (2019): Current trends in in silico, in vitro toxicology, and safety biomarkers in early drug development. In: *Drug and chemical toxicology* 42 (2), S. 113–121. DOI: 10.1080/01480545.2017.1400044.
- Lontok, Erik; Corse, Emily; Machamer, Carolyn E. (2004): Intracellular targeting signals contribute to localization of coronavirus spike proteins near the virus assembly site. In: *Journal of virology* 78 (11), S. 5913–5922. DOI: 10.1128/JVI.78.11.5913-5922.2004.

- Lv, Zhengtong; Chu, Yuan; Wang, Yong (2015): HIV protease inhibitors: a review of molecular selectivity and toxicity. In: HIV/AIDS (Auckland, N.Z.) 7, S. 95–104. DOI: 10.2147/HIV.S79956.
- Ma, Kevin C.; Shirk, Philip; Lambrou, Anastasia S.; Hassell, Norman; Zheng, Xiao-Yu; Payne, Amanda B. et al. (2023): Genomic Surveillance for SARS-CoV-2 Variants: Circulation of Omicron Lineages - United States, January 2022-May 2023. In: MMWR Morb Mortal Wkly Rep 72 (24), S. 651–656. DOI: 10.15585/mmwr.mm7224a2.
- Maiese, Aniello; Manetti, Alice Chiara; Bosetti, Chiara; Del Duca, Fabio; La Russa, Raffaele; Frati, Paola et al. (2021): SARS-CoV-2 and the brain: A review of the current knowledge on neuropathology in COVID-19. In: Brain Pathology 31 (6), e13013. DOI: 10.1111/bpa.13013.
- Malo, Nathalie; Hanley, James A.; Cerquozzi, Sonia; Pelletier, Jerry; Nadon, Robert (2006): Statistical practice in high-throughput screening data analysis. In: Nature biotechnology 24 (2), S. 167–175. DOI: 10.1038/nbt1186.
- Malone, Brandon; Urakova, Nadya; Snijder, Eric J.; Campbell, Elizabeth A. (2022): Structures and functions of coronavirus replication-transcription complexes and their relevance for SARS-CoV-2 drug design. In: Nature reviews. Molecular cell biology 23 (1), S. 21–39. DOI: 10.1038/s41580-021-00432-z.
- Marzi, Mahrokh; Vakil, Mohammad Kazem; Bahmanyar, Maryam; Zarenezhad, Elham (2022): Paxlovid: Mechanism of Action, Synthesis, and In Silico Study. In: BioMed research international 2022, S. 7341493. DOI: 10.1155/2022/7341493.
- Mathieu, Edouard; Hannah Ritchie; Lucas Rod s-Guirao; Cameron Appel; Daniel Gavrilo ; Charlie Giattino et al. (2026): <https://ourworldindata.org/coronavirus>. Online verf gbar unter <https://ourworldindata.org/coronavirus>, zuletzt aktualisiert am 08.05.2026.
- Mayer, Leonie; Weskamm, Leonie M.; Fathi, Anahita; Kono, Maya; Heidepriem, Jasmin; Kr hling, Verena et al. (2024): MVA-based vaccine candidates encoding the native or prefusion-stabilized SARS-CoV-2 spike reveal differential immunogenicity in humans. In: NPJ Vaccines 9 (1), S. 20. DOI: 10.1038/s41541-023-00801-z.
- McLean, Gary; Kamil, Jeremy; Lee, Benhur; Moore, Penny; Schulz, Thomas F.; Muik, Alexander et al. (2022): The Impact of Evolving SARS-CoV-2 Mutations and Variants on COVID-19 Vaccines. In: mBio 13 (2), e0297921. DOI: 10.1128/mbio.02979-21.
- Meanwell, Nicholas A. (2018): Fluorine and Fluorinated Motifs in the Design and Application of Bioisosteres for Drug Design. In: J. Med. Chem. 61 (14), S. 5822–5880. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b01788.
- Melikian, George L.; Rhee, Soo-Yon; Taylor, Jonathan; Fessel, W. Jeffrey; Kaufman, David; Towner, William et al. (2012): Standardized comparison of the relative impacts of HIV-1 reverse transcriptase (RT) mutations on nucleoside RT inhibitor susceptibility. In: Antimicrobial agents and chemotherapy 56 (5), S. 2305–2313. DOI: 10.1128/AAC.05487-11.
- Meyerowitz, Eric A.; Richterman, Aaron; Gandhi, Rajesh T.; Sax, Paul E. (2021): Transmission of SARS-CoV-2: A Review of Viral, Host, and Environmental Factors. In: Annals of internal medicine 174 (1), S. 69–79. DOI: 10.7326/M20-5008.
- Michelini, Elisa; Cevenini, Luca; Mezzanotte, Laura; Coppa, Andrea; Roda, Aldo (2010): Cell-based assays: fuelling drug discovery. In: Analytical and bioanalytical chemistry 398 (1), S. 227–238. DOI: 10.1007/s00216-010-3933-z.
- Mock, Ulrike; Riecken, Kristoffer; Biedien, Belinda; Qasim, Waseem; Chan, Emma; Cathomen, Toni; Fehse, Boris (2014): Novel lentiviral vectors with mutated reverse transcriptase for mRNA delivery of TALE nucleases. In: Scientific reports 4, S. 6409. DOI: 10.1038/srep06409.
- Mohme, Malte; Maire, Cecile L.; Riecken, Kristoffer; Zapf, Svenja; Aranyosy, Tim; Westphal, Manfred et al. (2017): Optical Barcoding for Single-Clone Tracking to Study Tumor Heterogeneity. In: Molecular

- therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy 25 (3), S. 621–633. DOI: 10.1016/j.ymthe.2016.12.014.
- Morita, S.; Kojima, T.; Kitamura, T. (2000): Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. In: Gene therapy 7 (12), S. 1063–1066. DOI: 10.1038/sj.gt.3301206.
- Moriyama, Saya; Adachi, Yu; Sato, Takashi; Tonouchi, Keisuke; Sun, Lin; Fukushi, Shuetsu et al. (2021): Temporal maturation of neutralizing antibodies in COVID-19 convalescent individuals improves potency and breadth to circulating SARS-CoV-2 variants. In: Immunity 54 (8), 1841-1852.e4. DOI: 10.1016/j.immuni.2021.06.015.
- Moso, Michael A.; Roche, Michael; Ceva, Paula M.; Lewin, Sharon R. (2025): CRISPR/Cas9 for achieving postintervention HIV control. In: Current opinion in HIV and AIDS 20 (5), S. 432–440. DOI: 10.1097/COH.0000000000000963.
- Musa, Musiliyu A.; Cooperwood, John S.; Khan, M. Omar F.; Rahman, Taufiq (2011): In-vitro antiproliferative activity of benzopyranone derivatives in comparison with standard chemotherapeutic drugs. In: Archiv der Pharmazie 344 (2), S. 102–110. DOI: 10.1002/ardp.201000207.
- Naldini, L.; Blömer, U.; Gallay, P.; Ory, D.; Mulligan, R.; Gage, F. H. et al. (1996): In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. In: Science (New York, N.Y.) 272 (5259), S. 263–267. DOI: 10.1126/science.272.5259.263.
- Namazi, Nader (2022): The effectiveness of dexamethasone as a combination therapy for COVID-19. In: Acta pharmaceutica (Zagreb, Croatia) 72 (3), S. 345–358. DOI: 10.2478/acph-2022-0030.
- Nash, Denis; Yotebieng, Marcel; Sohn, Annette H. (2018): Treating all people living with HIV in sub-Saharan Africa: a new era calling for new approaches. In: Journal of Virus Eradication 4 (Suppl 2), S. 1–4. DOI: 10.1016/S2055-6640(20)30340-X.
- Nassar, Alaa-Eldin F.; Kamel, Amin M.; Clarimont, Caroline (2004): Improving the decision-making process in the structural modification of drug candidates: enhancing metabolic stability. In: Drug discovery today 9 (23), S. 1020–1028. DOI: 10.1016/S1359-6446(04)03280-5.
- Ng'uni, Tiza; Chasara, Caroline; Ndhlovu, Zaza M. (2020): Major Scientific Hurdles in HIV Vaccine Development: Historical Perspective and Future Directions. In: Frontiers in immunology 11, S. 590780. DOI: 10.3389/fimmu.2020.590780.
- Nicastri, Emanuele; Marinangeli, Franco; Pivetta, Emanuele; Torri, Elena; Reggiani, Francesco; Fiorentino, Giuseppe et al. (2022): A phase 2 randomized, double-blinded, placebo-controlled, multicenter trial evaluating the efficacy and safety of raloxifene for patients with mild to moderate COVID-19. In: EClinicalMedicine 48, S. 101450. DOI: 10.1016/j.eclinm.2022.101450.
- Nieto-Torres, Jose L.; DeDiego, Marta L.; Verdiá-Báguena, Carmina; Jimenez-Guardeño, Jose M.; Regla-Nava, Jose A.; Fernandez-Delgado, Raul et al. (2014): Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel activity promotes virus fitness and pathogenesis. In: PLoS pathogens 10 (5), e1004077. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004077.
- O Murchu, Eamon; Marshall, Liam; Teljeur, Conor; Harrington, Patricia; Hayes, Catherine; Moran, Patrick; Ryan, Mairin (2022): Oral pre-exposure prophylaxis (PrEP) to prevent HIV: a systematic review and meta-analysis of clinical effectiveness, safety, adherence and risk compensation in all populations. In: BMJ open 12 (5), e048478. DOI: 10.1136/bmjopen-2020-048478.
- Pal, Aastha; Ahirwar, Ashok Kumar; Sakarde, Apurva; Asia, Priyanka; Gopal, Niranjan; Alam, Sana et al. (2021): COVID-19 and cardiovascular disease: a review of current knowledge. In: Hormone molecular biology and clinical investigation 42 (1), S. 99–104. DOI: 10.1515/hmbci-2020-0052.
- Parkin, N. T.; Hellmann, N. S.; Whitcomb, J. M.; Kiss, L.; Chappey, C.; Petropoulos, C. J. (2004): Natural variation of drug susceptibility in wild-type human immunodeficiency virus type 1. In: Antimicrobial agents and chemotherapy 48 (2), S. 437–443. DOI: 10.1128/AAC.48.2.437-443.2004.

- Parua, Pijus; Ghosh, Somnath; Jana, Koushik; Seth, Arnab; Debnath, Biplab; Rout, Saroj Kumar et al. (2025): Therapeutic Potential of Neutralizing Monoclonal Antibodies (nMAbs) against SARS-CoV-2 Omicron Variant. In: *Current pharmaceutical design* 31 (10), S. 753–773. DOI: 10.2174/0113816128334441241108050528.
- Peng, Henry T.; Rhind, Shawn G.; Beckett, Andrew (2021): Convalescent Plasma for the Prevention and Treatment of COVID-19: A Systematic Review and Quantitative Analysis. In: *JMIR Public Health and Surveillance* 7 (4), e25500. DOI: 10.2196/25500.
- Pizzato, Massimo; Baraldi, Chiara; Boscato Sopetto, Giulia; Finozzi, Davide; Gentile, Carmelo; Gentile, Michele Domenico et al. (2022): SARS-CoV-2 and the Host Cell: A Tale of Interactions. In: *Front.Virol.* 1, Artikel 815388. DOI: 10.3389/fviro.2021.815388.
- Poorolajal, J.; Hooshmand, E.; Mahjub, H.; Esmailnasab, N.; Jenabi, E. (2016): Survival rate of AIDS disease and mortality in HIV-infected patients: a meta-analysis. In: *Public health* 139, S. 3–12. DOI: 10.1016/j.puhe.2016.05.004.
- Powell, David J.; Hertzberg, Robert P.; Macarrón, Ricardo (2016): Design and Implementation of High-Throughput Screening Assays. In: *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 1439, S. 1–32. DOI: 10.1007/978-1-4939-3673-1_1.
- Pushpakom, Sudeep; Iorio, Francesco; Eysers, Patrick A.; Escott, K. Jane; Hopper, Shirley; Wells, Andrew et al. (2019): Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. In: *Nature reviews. Drug discovery* 18 (1), S. 41–58. DOI: 10.1038/nrd.2018.168.
- Rabaan, Ali A.; Smajlović, Samira; Tombuloglu, Huseyin; Ćordić, Sabahudin; Hajdarević, Azra; Kudić, Nudžejma et al. (2023): SARS-CoV-2 infection and multi-organ system damage: A review. In: *Biomolecules & biomedicine* 23 (1), S. 37–52. DOI: 10.17305/bjbms.2022.7762.
- Rebendenne, Antoine; Valadão, Ana Luiza Chaves; Tauziet, Marine; Maarifi, Ghizlane; Bonaventure, Boris; McKellar, Joe et al. (2021): SARS-CoV-2 triggers an MDA-5-dependent interferon response which is unable to control replication in lung epithelial cells. In: *Journal of virology* 95 (8). DOI: 10.1128/JVI.02415-20.
- Rhee, Soo-Yon; Gonzales, Matthew J.; Kantor, Rami; Betts, Bradley J.; Ravela, Jaideep; Shafer, Robert W. (2003): Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and protease sequence database. In: *Nucleic acids research* 31 (1), S. 298–303. DOI: 10.1093/nar/gkg100.
- Rhee, Soo-Yon; Taylor, Jonathan; Wadhera, Gauhar; Ben-Hur, Asa; Brutlag, Douglas L.; Shafer, Robert W. (2006): Genotypic predictors of human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (46), S. 17355–17360. DOI: 10.1073/pnas.0607274103.
- Rhim, H.; Park, J.; Morrow, C. D. (1991): Deletions in the tRNA(Lys) primer-binding site of human immunodeficiency virus type 1 identify essential regions for reverse transcription. In: *Journal of virology* 65 (9), S. 4555–4564. DOI: 10.1128/JVI.65.9.4555-4564.1991.
- Roberts, J. D.; Bebenek, K.; Kunkel, T. A. (1988): The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. In: *Science* (New York, N.Y.) 242 (4882), S. 1171–1173. DOI: 10.1126/science.2460925.
- Roh, Vincent; Abramowski, Pierre; Hiou-Feige, Agnès; Cornils, Kerstin; Rivals, Jean-Paul; Zougman, Alexandre et al. (2018): Cellular Barcoding Identifies Clonal Substitution as a Hallmark of Local Recurrence in a Surgical Model of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. In: *Cell reports* 25 (8), 2208–2222.e7. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.10.090.
- Rössler, Annika; Netzl, Antonia; Knabl, Ludwig; Schäfer, Helena; Wilks, Samuel H.; Bante, David et al. (2022): BA.2 and BA.5 omicron differ immunologically from both BA.1 omicron and pre-omicron variants. In: *Nat Commun* 13 (1), S. 7701. DOI: 10.1038/s41467-022-35312-3.

- Saeidnia, Soodabeh; Manayi, Azadeh; Abdollahi, Mohammad (2015): From in vitro Experiments to in vivo and Clinical Studies; Pros and Cons. In: *Current drug discovery technologies* 12 (4), S. 218–224. DOI: 10.2174/1570163813666160114093140.
- Schwarze, Lea Isabell; Główny, Dawid; Sonntag, Tanja; Uhde, Almut; Fehse, Boris (2021a): Optimisation of a TALE nuclease targeting the HIV co-receptor CCR5 for clinical application. In: *Gene therapy* 28 (9), S. 588–601. DOI: 10.1038/s41434-021-00271-9.
- Schwarze, Lea Isabell; Sonntag, Tanja; Wild, Stefan; Schmitz, Sabrina; Uhde, Almut; Fehse, Boris (2021b): Automated production of CCR5-negative CD4+ T cells in a GMP-compatible, clinical scale for treatment of HIV-positive patients. In: *Gene therapy* 28 (9), S. 572–587. DOI: 10.1038/s41434-021-00259-5.
- Sedláček, Dalibor (2025): Current view on HIV-2 - epidemiology, diagnosis and treatment. In: *Central European journal of public health* 33 (3), S. 176–180. DOI: 10.21101/cejph.a8631.
- Seifert, Larissa; Riecken, Kristoffer; Zahner, Gunther; Hambach, Julia; Hagenstein, Julia; Dubberke, Gudrun et al. (2024): An antigen-specific chimeric autoantibody receptor (CAAR) NK cell strategy for the elimination of anti-PLA2R1 and anti-THSD7A antibody-secreting cells. In: *Kidney international* 105 (4), S. 886–889. DOI: 10.1016/j.kint.2024.01.021.
- Septisetyani, Endah Puji; Prasetyaningrum, Pekik Wiji; Anam, Khairul; Santoso, Adi (2021): SARS-CoV-2 Antibody Neutralization Assay Platforms Based on Epitopes Sources: Live Virus, Pseudovirus, and Recombinant S Glycoprotein RBD. In: *Immune Network* 21 (6), e39. DOI: 10.4110/in.2021.21.e39.
- Sette, Alessandro; Crotty, Shane (2021): Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. In: *Cell* 184 (4), S. 861–880. DOI: 10.1016/j.cell.2021.01.007.
- Sheahan, Timothy P.; Sims, Amy C.; Graham, Rachel L.; Menachery, Vineet D.; Gralinski, Lisa E.; Case, James B. et al. (2017): Broad-spectrum antiviral GS-5734 inhibits both epidemic and zoonotic coronaviruses. In: *Science translational medicine* 9 (396). DOI: 10.1126/scitranslmed.aal3653.
- Sherman, Emily J.; Emmer, Brian T. (2021): ACE2 protein expression within isogenic cell lines is heterogeneous and associated with distinct transcriptomes. In: *Scientific reports* 11 (1), S. 15900. DOI: 10.1038/s41598-021-95308-9.
- Shun, Ming-Chieh; Raghavendra, Nidhanapati K.; Vandegraaff, Nick; Daigle, Janet E.; Hughes, Siobhan; Kellam, Paul et al. (2007): LEDGF/p75 functions downstream from preintegration complex formation to effect gene-specific HIV-1 integration. In: *Genes & development* 21 (14), S. 1767–1778. DOI: 10.1101/gad.1565107.
- Siegel, Dustin; Hui, Hon C.; Doerffler, Edward; Clarke, Michael O.; Chun, Kwon; Zhang, Lijun et al. (2017): Discovery and Synthesis of a Phosphoramidate Prodrug of a Pyrrolo2,1-ftriazin-4-amino Adenine C-Nucleoside (GS-5734) for the Treatment of Ebola and Emerging Viruses. In: *Journal of medicinal chemistry* 60 (5), S. 1648–1661. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b01594.
- Simon, Viviana; Ho, David D.; Abdool Karim, Quarraisha (2006): HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. In: *Lancet (London, England)* 368 (9534), S. 489–504. DOI: 10.1016/S0140-6736(06)69157-5.
- Ślarczyńska, Karolina; Gunia-Krzyżak, Agnieszka; Koczurkiewicz, Paulina; Wójcik-Pszczółka, Katarzyna; Żelaszczyk, Dorota; Popiół, Justyna; Pękala, Elżbieta (2019): Metabolic stability and its role in the discovery of new chemical entities. In: *Acta pharmaceutica (Zagreb, Croatia)* 69 (3), S. 345–361. DOI: 10.2478/acph-2019-0024.
- Snijder, Eric J.; Limpens, Ronald W. A. L.; Wilde, Adriaan H. de; Jong, Anja W. M. de; Zevenhoven-Dobbe, Jessica C.; Maier, Helena J. et al. (2020): A unifying structural and functional model of the coronavirus replication organelle: Tracking down RNA synthesis. In: *PLoS Biology* 18 (6), e3000715. DOI: 10.1371/journal.pbio.3000715.

- Stegemann, S.; Leveiller, F.; Franchi, D.; Jong, H. de; Lindén, H. (2007): When poor solubility becomes an issue: From early stage to proof of concept. In: *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 31 (5), S. 249–261. DOI: 10.1016/j.ejps.2007.05.110.
- Strebel, Klaus (2013): HIV accessory proteins versus host restriction factors. In: *Current opinion in virology* 3 (6), S. 692–699. DOI: 10.1016/j.coviro.2013.08.004.
- Sulkowski, Mark S.; Thomas, David L.; Mehta, Shruti H.; Chaisson, Richard E.; Moore, Richard D. (2002): Hepatotoxicity associated with nevirapine or efavirenz-containing antiretroviral therapy: Role of hepatitis C and B infections. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 35 (1), S. 182–189. DOI: 10.1053/jhep.2002.30319.
- Sun, Yeqing; Huang, Weijin; Xiang, Hongyu; Nie, Jianhui (2024): SARS-CoV-2 Neutralization Assays Used in Clinical Trials: A Narrative Review. In: *Vaccines* 12 (5). DOI: 10.3390/vaccines12050554.
- Tannenbaum, Jerrold; Bennett, B. Taylor (2015): Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. In: *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS* 54 (2), S. 120–132.
- Thakur, Vikram; Bhola, Shivam; Thakur, Pryanka; Patel, Sanjay Kumar Singh; Kulshrestha, Saurabh; Ratho, Radha Kanta; Kumar, Pradeep (2022): Waves and variants of SARS-CoV-2: understanding the causes and effect of the COVID-19 catastrophe. In: *Infection* 50 (2), S. 309–325. DOI: 10.1007/s15010-021-01734-2.
- Tocco, Graziella; Canton, Serena; Laus, Antonio; Caboni, Pierluigi; Le Grice, Stuart F. J.; Tramontano, Enzo; Esposito, Francesca (2023): Dihydroxyphenyl- and Heteroaromatic-Based Thienopyrimidinones to Tackle HIV-1 LEDGF/p75-Dependent IN Activity. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 28 (18). DOI: 10.3390/molecules28186700.
- Tough, Riley H.; McLaren, Paul J. (2018): Interaction of the Host and Viral Genome and Their Influence on HIV Disease. In: *Frontiers in Genetics* 9, S. 720. DOI: 10.3389/fgene.2018.00720.
- Tozzi, Valerio; Zaccarelli, Mauro; Narciso, Pasquale; Trotta, Maria Paola; Ceccherini-Silberstein, Francesca; Longis, Patrizio de et al. (2004): Mutations in HIV-1 reverse transcriptase potentially associated with hypersusceptibility to nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitors: effect on response to efavirenz-based therapy in an urban observational cohort. In: *The Journal of infectious diseases* 189 (9), S. 1688–1695. DOI: 10.1086/382960.
- UNAIDS 90-90-90 2014: 90-90-90: An ambitious treatment target to help end the AIDS epidemic 2014. Online verfügbar unter https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/90-90-90_en.pdf, zuletzt geprüft am 20.08.2024.
- UNAIDS Fact Sheet 2025: Fact sheet - Latest global and regional statistics on the status of the AIDS epidemic. Online verfügbar unter <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>, zuletzt geprüft am 08.05.2026.
- UNAIDS Report 2024: 2024 global AIDS report — The Urgency of Now: AIDS at a Crossroads. Online verfügbar unter https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/2024-unaids-global-aids-update_en.pdf, zuletzt geprüft am 20.08.2024.
- UNAIDS Update (2025): UNAIDS Global AIDS Update 2025. AIDS, Crisis and the Power to Transform. Erscheinungsort nicht ermittelbar: United Nations. Online verfügbar unter <https://www.un-ilibrary.org/content/books/9789211544350>.
- van der Hoek, Lia (2007): Human Coronaviruses: What Do They Cause? In: *Antiviral Therapy* 12 (4_part_2), S. 651–658. DOI: 10.1177/135965350701200S01.1.
- Vingerhoets, Johan; Azijn, Hilde; Fransen, Els; Baere, Inky de; Smeulders, Liesbet; Jochmans, Dirk et al. (2005): TMC125 displays a high genetic barrier to the development of resistance: evidence from in vitro selection experiments. In: *Journal of virology* 79 (20), S. 12773–12782. DOI: 10.1128/JVI.79.20.12773-12782.2005.

- Waheed, Abdul A.; Freed, Eric O. (2009): Lipids and membrane microdomains in HIV-1 replication. In: *Virus research* 143 (2), S. 162–176. DOI: 10.1016/j.virusres.2009.04.007.
- Wang, Xiaoyu; Ma, Cuicui; Rodríguez Labrada, Roberto; Qin, Zhou; Xu, Ting; He, Zhiyao; Wei, Yuquan (2021): Recent advances in lentiviral vectors for gene therapy. In: *Science China. Life sciences* 64 (11), S. 1842–1857. DOI: 10.1007/s11427-021-1952-5.
- Weber, K.; Mock, U.; Petrowitz, B.; Bartsch, U.; Fehse, B. (2010): Lentiviral gene ontology (LeGO) vectors equipped with novel drug-selectable fluorescent proteins: new building blocks for cell marking and multi-gene analysis. In: *Gene therapy* 17 (4), S. 511–520. DOI: 10.1038/gt.2009.149.
- Weber, Kristoffer; Bartsch, Udo; Stocking, Carol; Fehse, Boris (2008): A multicolor panel of novel lentiviral "gene ontology" (LeGO) vectors for functional gene analysis. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 16 (4), S. 698–706. DOI: 10.1038/mt.2008.6.
- Weber, Kristoffer; Thomaschewski, Michael; Warlich, Michael; Volz, Tassilo; Cornils, Kerstin; Niebuhr, Birte et al. (2011): RGB marking facilitates multicolor clonal cell tracking. In: *Nature medicine* 17 (4), S. 504–509. DOI: 10.1038/nm.2338.
- Wegehaupt, Oliver; Endo, Akira; Vassall, Anna (2023): Superspreading, overdispersion and their implications in the SARS-CoV-2 (COVID-19) pandemic: a systematic review and meta-analysis of the literature. In: *BMC public health* 23 (1), S. 1003. DOI: 10.1186/s12889-023-15915-1.
- Welcome, Menizibeya O.; Mastorakis, Nikos E. (2021): Neuropathophysiology of coronavirus disease 2019: neuroinflammation and blood brain barrier disruption are critical pathophysiological processes that contribute to the clinical symptoms of SARS-CoV-2 infection. In: *Inflammopharmacology* 29 (4), S. 939–963. DOI: 10.1007/s10787-021-00806-x.
- Wensing, Annemarie M.; Calvez, Vincent; Günthard, Huldrych F.; Johnson, Victoria A.; Paredes, Roger; Pillay, Deenan et al. (2016): 2017 Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1. In: *Topics in antiviral medicine* 24 (4), S. 132–133.
- WHO (2015): Guideline on when to start antiretroviral therapy and on pre-exposure prophylaxis for HIV. Geneva: World Health Organization.
- WHO (2020): "WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 – 11 March 2020" World Health Organization (WHO) (Press release). 11 March 2020., zuletzt geprüft am 08.05.2026.
- WHO Covid-19 Dashboard (2026): COVID-19 deaths | WHO COVID-19 dashboard. Online verfügbar unter <https://data.who.int/dashboards/covid19/deaths?n=o>, zuletzt aktualisiert am 08.05.2026, zuletzt geprüft am 08.05.2026.
- Witt, Marius; Oliveira-Ferrer, Leticia; Koch-Nolte, Friedrich; Menzel, Stephan; Hell, Louisa; Sturmheit, Tabea et al. (2024): Expression of CD39 is associated with T cell exhaustion in ovarian cancer and its blockade reverts T cell dysfunction. In: *Oncoimmunology* 13 (1), S. 2346359. DOI: 10.1080/2162402X.2024.2346359.
- Woens, Jannis (2018): Validation of HIV inhibitors from a high-throughput screening. Masterarbeit. Universität Hamburg, Hamburg. Fakultät für Chemie.
- Wrapp, Daniel; Vlieger, Dorien de; Corbett, Kizzmekia S.; Torres, Gretel M.; Wang, Nianshuang; van Breedam, Wander et al. (2020): Structural Basis for Potent Neutralization of Betacoronaviruses by Single-Domain Camelid Antibodies. In: *Cell* 181 (5), 1004-1015.e15. DOI: 10.1016/j.cell.2020.04.031.
- Xu, Jianliang; Xu, Kai; Jung, Seolkyoung; Conte, Andrea; Lieberman, Jenna; Muecksch, Frauke et al. (2021): Nanobodies from camelid mice and llamas neutralize SARS-CoV-2 variants. In: *Nature* 595 (7866), S. 278–282. DOI: 10.1038/s41586-021-03676-z.
- Xu, Qing; Zhao, Mengyu; Wang, Qin; He, Yanwen; Ye, Guanting; Yang, Junyi et al. (2026): Chronic fatigue syndrome: From etiology and mechanism to diagnosis and treatment. In: *Journal of psychiatric research* 196, S. 171–184. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2026.02.026.

- Xu, Zhe; Shi, Lei; Wang, Yijin; Zhang, Jiyuan; Huang, Lei; Zhang, Chao et al. (2020): Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. In: *The Lancet. Respiratory Medicine* 8 (4), S. 420–422. DOI: 10.1016/S2213-2600(20)30076-X.
- Yadav, Jagat Pal; Yadav, Seema; Dubey, Nimesh Kumar; Yadav, Indra Pal; Pathak, Prateek; Verma, Amita (2026): Lingering echoes of SARS-CoV-2: mechanistic insights and management of long COVID syndrome. In: *Inflammopharmacology* 34 (1), S. 17–46. DOI: 10.1007/s10787-025-02062-9.
- Yáñez-Muñoz, Rafael J.; Balaggan, Kamaljit S.; MacNeil, Angus; Howe, Steven J.; Schmidt, Manfred; Smith, Alexander J. et al. (2006): Effective gene therapy with nonintegrating lentiviral vectors. In: *Nature medicine* 12 (3), S. 348–353. DOI: 10.1038/nm1365.
- Yet, Mabel; Teo, Hui Sheung; Kwa, Hannah; Yeo, Joseph; Wang, Samuel S. Y. (2026): Long COVID: a review of mechanisms and treatment modalities. In: *Inflammopharmacology* 34 (2), S. 1111–1121. DOI: 10.1007/s10787-025-02071-8.
- Zhang, J. H.; Chung, T. D.; Oldenburg, K. R. (1999): A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. In: *Journal of biomolecular screening* 4 (2), S. 67–73. DOI: 10.1177/108705719900400206.
- Zhao, Tianyi; Huang, Xiaoping; Shu, Yuelong (2023): Comparing the immune response and protective effect of COVID-19 vaccine under different vaccination strategies. In: *Human vaccines & immunotherapeutics* 19 (3), S. 2273155. DOI: 10.1080/21645515.2023.2273155.
- Zheng, Qian; Ma, Pengfei; Wang, Mingwei; Cheng, Yongran; Zhou, Mengyun; Ye, Lan et al. (2023): Efficacy and safety of Paxlovid for COVID-19: a meta-analysis. In: *The Journal of infection* 86 (1), S. 66–117. DOI: 10.1016/j.jinf.2022.09.027.
- Zhou, Peng; Yang, Xing-Lou; Wang, Xian-Guang; Hu, Ben; Zhang, Lei; Zhang, Wei et al. (2020): A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. In: *Nature* 579 (7798), S. 270–273. DOI: 10.1038/s41586-020-2012-7.
- Zhu, Na; Zhang, Dingyu; Wang, Wenling; Li, Xingwang; Yang, Bo; Song, Jingdong et al. (2020): A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. In: *The New England journal of medicine* 382 (8), S. 727–733. DOI: 10.1056/NEJMoa2001017.

9. Anhang: Auflistung der verwendeten Gefahrstoffe

Antiretrovirale Wirkstoffe wurden aus pharmazeutischen Tablettenpräparaten extrahiert. In die Gefahrstoffliste wurden nur diejenigen aufgenommen, für die eine eindeutige Gefahrstoffklassifizierung der verwendeten Darreichungsform existiert.

Gefahrstoff	Gefahrensymbol	H-Sätze	P-Sätze
Antifect N Liquid	 	H226, H319, H336	P210, P261, P271, P280, P305+P351+P338, P337+P313, P501
CaCl ₂		H319	P264, P280, P305+P351+P338, P337+P313
Chloroquin-diphosphat (Salz)		H302	P264, P301+P330+P331, P312
Hexadimethrin-bromid (Polybren)		H302	P264, P301+312
Natriumhydroxid (NaOH)		H290, H314	P234, P260, P280, P303+P361+P353, P304+P340+P310, P305+P351+P338
Puromycin		H302	P264, P270, P301+P312, P330
Blasticidin		H302	P264, P270, P301+P312, P330, P501
Zeocin	 	H302, H341	P202, P264, P270, P301+P312, P308+P313, P501
Efavirenz	 	H302, H319, H360D, H372 (ZNS, Haut)	P201, P202, P260, P264, P270, P280, P301+P312+P330, P305+P351+P338, P308+P313, P337+P313, P405, P501
Raltegravir	  	H318, H361d	P201, P202, P261, P271, P280, P304+340+P312, P305+P351+P338+P310, P308+P313, P405, P501
Raloxifen		H351, H361d	P201, P202, P280, P308+313, P401, P501

H-Code	Wortlaut
H226	Flüssigkeit und Dampf entzündbar.
H290	Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
H302	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
H314	Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.
H318	Verursacht schwere Augenschäden.
H319	Verursacht schwere Augenreizung.
H336	Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
H341	Kann vermutlich genetische Defekte verursachen.
H360D	Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
H361d	Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.
H372 (ZNS, Haut)	Schädigt die Organe (zentrales Nervensystem, Haut) bei längerer oder wiederholter Exposition.

P-Code	Wortlaut
P201	Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
P202	Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.
P210	Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen sowie anderen Zündquellenarten fernhalten. Nicht rauchen.
P234	Nur in Originalverpackung aufbewahren.
P260	Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen.
P261	Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden.
P264	Nach Gebrauch Gesicht/Hände/exponierte Haut gründlich waschen
P270	Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen.
P271	Nur im Freien oder in gut belüfteten Räumen verwenden.
P280	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
P301+P312	Bei Verschlucken: Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum/Arzt anrufen.
P301+P312+P330	Bei Verschlucken: Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum/Arzt anrufen. Mund ausspülen.
P301+P330+P331	Bei Verschlucken: Mund ausspülen. Kein Erbrechen herbeiführen.
P303+P361+P353	Bei Berührung mit der Haut [oder dem Haar]: Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen [oder duschen].
P304+P340+P310	Bei Einatmen: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen. Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
P304+P340+P312	Bei Einatmen: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen. Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum/Arzt anrufen.
P305+P351+P338	Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
P308+P313	Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P330	Mund ausspülen.
P337+P313	Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P405	Unter Verschluss aufbewahren.
P501	Inhalt und Behälter zugelassener Entsorgungsstelle zuführen.

10. Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Boris Fehse für die Möglichkeit, über die vielen Jahre in seiner Arbeitsgruppe zu forschen und zu lernen. Meine Arbeit konnte ich stets selbstständig und eigenverantwortlich planen und durchführen und habe dabei nicht nur fachlich, sondern auch persönlich viel lernen dürfen.

Für die besonders geduldige praktische Betreuung, das Korrekturlesen, den feinfühligsten Umgang mit diversen Rückschlägen und unzählige nette Kaffeepausen möchte ich mich bei Dr. Kristoffer Riecken bedanken.

Ich danke Stefan Horn für die Sicherheitseinweisungen auch außerhalb der Reihe und die Bereitschaft, so manche Frage nach Aufbewahrung, Entsorgung und anderen Vorschriften zwei- oder dreimal zu beantworten.

Der FACS Core Facility des UKE danke ich für die Unterstützung bei durchflusszytometrischen Messungen und insbesondere beim Cell-Sorting.

Allen weiteren ehemaligen und aktuellen Kolleg*innen der ganzen KMT möchte ich für das nette Arbeitsumfeld und die vielen schönen Gespräche bei und jenseits der Arbeit danken.

Für die Zusammenarbeit in den verschiedenen Projekten, die zu dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich mich insbesondere bei Dr. Bernhard Ellinger und Dr. Maria Kuzikov, Dr. Alessa Schaffrath und der AG Koch-Nolte, sowie Dr. Leonie Mayer und der AG Addo bedanken.

Ich bedanke mich bei der Friedrich-Ebert-Stiftung für die Förderung dieser Arbeit, die mir vor allem die Flexibilität gegeben hat, sie an die Bedingungen der Pandemie anzupassen.

Ich danke meiner Familie für ihre Unterstützung und ihr Vertrauen, das meinen gesamten schulischen und akademischen Weg begleitet und diesen letzten, anspruchsvollsten Abschluss möglich gemacht hat.

Mein besonderer Dank gilt auch meiner Frau Alexandra Rauwolf, die dieses lange Projekt mit all seinen Herausforderungen mitgetragen hat. Die mir in dieser Zeit eine unersetzliche Stütze für Herausforderungen in und außerhalb des Labors war.

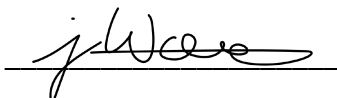
11. Disclaimer

Die in dieser Arbeit genannten Produkt-, Handels- und Markennamen können markenrechtlich geschützt sein. Auch wenn eine gesonderte Kennzeichnung im Einzelfall nicht erfolgt, bleiben sämtliche Schutzrechte unberührt.

12. Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben. Sofern im Zuge der Erstellung der vorliegenden Dissertationsschrift generative Künstliche Intelligenz (gKI) basierte elektronische Hilfsmittel verwendet wurden, versichere ich, dass meine eigene Leistung im Vordergrund stand und dass eine vollständige Dokumentation aller verwendeten Hilfsmittel gemäß der Guten wissenschaftlichen Praxis vorliegt. Ich trage die Verantwortung für eventuell durch die gKI generierte fehlerhafte oder verzerrte Inhalte, fehlerhafte Referenzen, Verstöße gegen das Datenschutz- und Urheberrecht oder Plagiate

Hamburg, September 2026



Jannis Hendrik Woens